

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumis

Bakalaureusetöö

12 EAP

Helen Kiik

Juhendajad emeriitdotsent Sulev Ingerpuu

MSc Artjom Stepanjuk

TARTU 2017

INFOLEHT

Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumis

Käesolevas töös uuriti laminiini ahelate ekspressiooni endomeetriumi epiteeli rakuliinides RL95-2 ja HEC-1-A, võrrelduna normaalse endomeetriumi epiteelirakkudega. Lisaks kirjeldati laminiini ahelaid stroomarakkudes ja nende poolt moodustatud rakuvälises maatriksis ning laminiini ahelate dünaamikat endomeetriumis retseptiivsuse saavutamisel. Tulemused rakuliinide ja epiteelirakkude võrdlusest näitasid, et endomeetriumi retseptiivse faasi epiteeli basaalmembraani koostises on laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$, $\gamma 1$ -ahelad ning tõenäoliselt $\gamma 2$ -ahelad ja laminiin-332 trimeer. Retseptiivse faasi stroomarakud ekspresseerivad $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelaid ja samuti võib eeldada $\gamma 2$ -ahela ning laminiini-332 trimeeri olemasolu lisaks immuunsadestatud laminiini-111, -411, -311, -511 isovormidele. Sekretoorse faasi jooksul tõuseb endomeetriumis laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelate ekspressioon.

Märksõnad: endomeetrium, rakkudeväline maatriks, laminiinid

CERCS kood: B210 histoloogia, tsütokeemia, histokeemia, koekultuurid

Expression of laminin chains in the human endometrium

In the present study, the expression of laminin chains by the human uterine epithelial cell lines RL95-2 and HEC-1-A was observed and compared with normal endometrial epithelial cells. Furthermore, the synthesis of laminin chains and isoforms by the endometrial stromal cells were described and the tissue-specific expression dynamics of laminin chains in the acquisition of receptivity was evaluated. The results of the comparison between cell lines and epithelial cells imply that laminin chains $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ and most likely $\gamma 2$ chain as well as laminin-332 trimer are components of the epithelial basement membrane in the receptive endometrium. Receptive phase stromal cells express $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ and $\gamma 1$ chains and expression of $\gamma 2$ chain and laminin-332 are also expected in addition to the immunoprecipitated laminin-111, -411, -311, -511 isoforms. Upregulation of laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ and $\gamma 1$ chains was observed during the secretory phase endometrium.

Keywords: endometrium, extracellular matrix, laminins

CERCS code: B210 histology, cytochemistry, histochemistry, tissue culture

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	6
1. Kirjanduse ülevaade.....	7
1.1. Endomeetrium ja selle ehitus	7
1.1.1. Endomeetriumi epiteelirakud	7
1.1.2. Endomeetriumi stroomarakud	8
1.2. Menstruaaltsükkel.....	9
1.3. Rakuväline maatriks.....	11
1.4. Laminiinid	11
1.5. Detsidualiseerumine.....	14
1.6. Loote implanteerumine	14
1.7. Endometrioos.....	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	17
2.1. Töö eesmärgid	17
2.2. Materjalid ja metoodika	18
2.2.1. Kasutatud antikehad.....	18
2.2.2. Kasutatud rakud ja koeproovid.....	20
2.2.3. Rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A kasvatamine	20
2.2.4. Rakkude lüüsimine ja rakuvälise maatriksi eraldamine.....	21
2.2.5. Rakuvälise maatriksi valkude segu kontsentreerimine.....	21
2.2.6. Valkude kontsentratsiooni mõõtmine	21
2.2.7. SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforees ja immuunlaigutus analüüs	22
2.2.8. Rakulüsaatide ja rakuvälise maatriksi valkude immuunsadestamine.....	22
2.2.9. Varemkinnitunud antikehade eemaldamine PVDF membraanilt.....	22
2.3. Tulemused	23
2.3.1. Laminiini ahelate ekspressioon rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A rakkudes ning normaalse endomeetriumi epiteelirakkudes	23
2.3.2. Laminiini ahelate ekspressioon rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A rakuvälises maatriksis	24
2.3.3. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi stroomarakkudes ning nende rakuvälises maatriksis	25

2.3.4. Laminiini trimeersete isovormide ekspressioon inimese endomeetriumi stroomarakkudes ning rakuvälises maatriksis	27
2.3.5. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi koes	28
2.3.6. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi epiteelirakkudes menstruaaltsükli erinevatel ajahetkedel	30
2.4. Arutelu	31
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	38
TÄNUAVALDUS	40
KIRJANDUSE LOETELU	41
LIHTLITSENTS	47

KASUTATUD LÜHENDID

BCA - bitsinkoonhape

DTT – ditiotritool

ECM – ekstratsellulaarne maatriks ehk rakuvaheaine (ingl *extracellular matrix*)

ECSC – endometrioosi stroomarakud

EGF – epidermaalne kasvufaktor (ingl *epidermal growth factor*)

EHS – Engelbreth-Holm-Swarm

FBS – veiselooteseerum (ingl *fetal bovine seerum*)

FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon

HRP – mädarõika peroksüdaas (ingl *horseradish peroxidase*)

IVF – kehaväline viljastamine (ingl *in vitro fertilization*)

LG – laminiini globulaarne domeen

LH – luteiniseeriv hormoon

LM – laminiin

LN – laminiini N-terminaalne globulaarne domeen

MAK – monoklonaalne antikeha

MAPK – mitogenei aktiveeritud proteiini kinaas (ingl *mitogen-activated protein kinase*)

NESC – normaalsed endomeetriumi stroomarakud

OE2 – östradiool

SSC – soomusrakuline kartsinoom

P4 – progesteron

PAK – polükloonaalne antikeha

PMSF – fenüülmetüülsulfonüülfluoriid (ingl *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PVDF – polüvinülideenfluoriid (ingl *polyvinylidene fluoride*)

RIPA puhver – (ingl *radioimmunoprecipitation assay buffer*)

SISSEJUHATUS

Emakas on reproduktiivorgan, mille põhiline funktsioon on võimaldada viljakas eas naistel järglaste saamist. Erinevalt teistest imetajatest on inimeste ja kõrgemate primaatide rasestumine ning raseduse väljakandmine väga keeruline protsess, mille õnnestumiseks on vaja läbida mitmetasandiline kontroll. Õnnestunud viljastumise korral peab blastotsüst olema võimeline kinnituma emaka limaskestast ehk endomeetriumi epiteelile ning läbima selle aluse basaalmembraani ning lisaks veel stroomarakkude vahelise maatriksi. Trofoblasti rakud on väga invasiivsed, sest nende eesmärgiks on jõuda ema vereringeni, et tagada ühendus, mille kaudu saab loode arenguks vajalikke toitaineid. Vastukaaluks trofoblastide invasioonile peab endomeetrium olema piisavalt vastupanuvõimeline, et vältida liigsest invasioonist tekkivaid komplikatsioone. Samuti peab see vastupanu olema mõõdukas, et siiski tagada õnnestunud implantatsioon. Kui ei toimu viljastumist või ebaõnnestub implantatsioon, siis endomeetrium irdub, et võimaldada edukat implantatsiooni järgmise tsükli käigus. Suur roll selles protsessis laskub endomeetriumi rakkudevahelisel maatriksil, millest trofoblasti rakud peavad läbi tungima. Maatriksi modelleerimise kaudu kindlustab endomeetrium keskkonna, mis oleks täpselt paras edukaks implantatsiooniks. Selle tagamiseks on endomeetrium retseptiivne vaid kindlal perioodil, mida nimetatakse implantatsiooni aknaks. Rakkude funktsioone, kaasaarvatud adhesiooni ja migreerumist, reguleerivad rakkudevälise maatriksi valgud laminiinid. Ka rasedusel vahendavad need trofoblastide invasiooni endomeetriumis. Seega peab tõenäoliselt ka laminiinide kooslus endomeetriumi arengutsükli käigus, implantatsiooni hetkel, raseduse saavutamisel ja säilitamisel olema täpselt reguleeritud. Kõrvalekalded sellest võivad avalduda trofoblastide liigsest invasioonist tekkivate tüsistustena (*placenta accreta*, *placenta increta*, *placenta percreta*), ebapiisavast invasioonist tulenevate tüsistustena (preeklampsia, viljatus) ning endometrioosina. Selleks, et mõista laminiini kooslusest tulenevaid patoloogiaid, on vaja teada, millised laminiinid ekspresseeruvad normaalses endomeetriumis ning millist funktsiooni omavad muutused nende koostises.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli kirjeldada laminiini ahelate ekspressiooni inimese endomeetriumi epiteelirakkudes ja stroomarakkudes. Selleks kasutati endomeetriumi epiteeli rakuliine, mis vastavad retseptiivsele ja mitteretseptiivsele endomeetriumile, ning koest eraldatud epiteeli- ning stroomarakke. Laminiinide dünaamika uurimiseks kasutati endomeetriumi erinevatel arengufaasidel eraldatud koeproove.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Endomeetrium ja selle ehitus

Emaka sisepinda vooderdab emaka limaskest ehk endomeetrium, mis jaotub funktsionaal- ning basaalkihiks. Emaka limaskesta katavad epiteelirakud, mille all paikneb sidekoeline strooma koos näärmete ja veresoontega. Menstruaaltsükli käigus toimuvad endomeetriumis morfoloogilised ning füsioloogilised muutused: funktsionaalkihi irdumine, taastumine ning sekretsioon. Taastumise perioodil toimub strooma-, endoteeli- ning luumenit katvate mesodermaalset päritolu epiteeli- ja näärmeepiteeli rakkude pidev jagunemine (Ferency ja Bergeron 1991; Ferency ja Guralnicik 1983; Arnold *et al.* 2001).

1.1.1. Endomeetriumi epiteelirakud

Endomeetriumis eristatakse valendiku epiteeli ning näärmelist epiteeli. Emaka limaskesta pinda katab valendiku epiteel, mille all paikneb basaalmembraan, mis toetab epiteelirakke ja eraldab neid stroomast. Lisaks vahendab valendiku epiteel implanteeruva blastotsüsti esmast kontakti endomeetriumi pinnaga ja võimaldab seeläbi blastotsüsti sisenemise endomeetriumis.

Varajases proliferatiivses faasis on östradiooli mõjutusel taastunud menstruatsiooni käigus irdunud funktsionaalkihi katteepiteeli rakud. Need pärinevad endomeetriumi basaalkihi alles jäänud näärmeepiteelist ning munajuhakitsust katvatest epiteelirakkudest (Ludwig ja Metzger 1976; Ferency ja Guralnicik 1983). Epiteeli taastumine on tihedalt seotud stroomarakkudega, mis areneva pinnaepiteeli all agregeeruvad ning vahendavad epiteelirakkude migreerumist. Rakkude polaarsus on tingitud epiteeli ja strooma vahelisest basaalmembraanist (Classen-Linke *et al.* 1997). Ka emaka näärmeid katab silinderepiteel, mille all laiub basaalmembraan (Cavazos *et al.* 1967). Proliferatiivse faasi jooksul, mis kestab kuni ovulatsioonini (Joonis 1), suureneb näärmeepiteelis mitooside arv ning ilmneb selle pseudostratifitseeritus (Ferency ja Guralnicik 1983; Cavazos *et al.* 1967).

Ovulatsioonile järgneb sekretoorne faas (Joonis 1), mille käigus inhibeerib progesteroon östradiooli poolt juhitud näärmeepiteeli rakkude jagunemist, valmistades katteepiteeli ette blastotsüsti vastuvõtmiseks. Lisaks sellele algab näärmeepiteeli rakkude sekretsioon (Ferency ja Guralnicik 1983). Nii katte- kui ka näärmeepiteeli rakkudel on hulgaliselt mikrohattusid, mis suurendavad rakkude pinda, ning ripsmeid. Ripsmed on olulised eelkõige seetõttu, et aitavad liigutada sekretoorses faasis apokriinsel sekretsioonil erituvat glükogeenirikast sekreeti. (Ferency ja Guralnicik 1983; Cornille *et al.* 1985).

Implantatsiooni hetkeks on katteepiteeli membraanile moodustunud väljasopistised ehk pinopoodid suures osas oma mikrohatud kaotanud (Nikas *et al.* 1999). Pinopoodid, mis tõenäoliselt vahendavad blastotsüsti adhesiooni, ei püsi kauem kui 48 tundi (Nikas *et al.* 1999; Bentin-Ley *et al.* 1999). Nimetus pinopoodid tuleneb nende pinotsütoosist aktiivsusest, mida on näidatud rottidel ja hiirtel, kuid inimese endomeetriumi pinopoodidel ei ole sellist omadust leitud, mistõttu soovitatakse inimese endomeetriumi väljasopististe kirjeldamisel kasutada terminit uterodoom (Adams *et al.* 2002; Murphy 2000; Männik 2010).

1.1.2. Endomeetriumi stroomarakud

Endomeetriumi epiteeli all asuvad fibroblastidele sarnased mesenhümaalset päritolu stroomarakud, mis samuti läbivad tsüklilisi muutusi. Katsetest, kus kasvatati strooma- ja epiteelirakke monokultuuridena või siis mõlemaid rakutüüpe koos, ilmnes, et nad kontrollivad teineteist basaalmembraani vahendusel. Nimelt kui stroomarakud juhivad epiteelirakkude jagunemist, polaarsuse teket ja diferentseerumist, siis epiteelirakud indutseerivad endomeetriumile kohase fenotüübi teket stroomarakkudes. (Arnold *et al.* 2001; Classen-Linke *et al.* 1997).

Endomeetriumi koelõikude põhjalik analüüs läbivalgustus elektronmikroskoopia abil on näidanud, et proliferatiivse faasi algul toimuva katteepiteeli taastumise järel on pindmised stroomarakud piklikud ja tihedamalt pakitud ning sügavamal asetsevad rakud ümmargused ja moodustavad hõredama rakkude kihi (Wienke *et al.* 1968). Neid rakke ümbritsev granulaarne rakuväline maatriks sisaldab kollageen tüüp I, III, V ning nende olemasolu on täheldatav terve tsükli jooksul (Aplin *et al.* 1988; Iwahashi *et al.* 1996; Aplin *et al.* 1995). Immunofluorestsentsmikroskoopia abil on nii proliferatiivse faasi kui ka varajase sekretoorse faasi stroomas leitud ka kollageen tüüp VI, ent detsidualiseerumise käigus selle hulk väheneb (Aplin *et al.* 1988; Aplin *et al.* 1995). Rottide puhul on näidatud, et kollageen tüüp VI kadumine detsidualiseerumisel ehk rakuvälise maatriksi ümbermodelleerimine on tõenäoliselt vajalik trofoblastide invasiooniks (Mulholland *et al.* 1992). Proliferatiivse faasi jooksul kasvab mitooside arv, mistõttu rakud on tihedamalt pakitud. Neid pikliku tuumaga rakke, mis sarnanevad fibroblastidele ning millel on suurenenud tsütoplasma hulk ning organellide arv, võib pidada stroomarakkudeks (Wienke *et al.* 1968). Suurimad muutused toimuvad sekretoorses faasis, kus rakud alustavad predetsidualiseerumist. Kui cAMP tase tõuseb, siis aktiveeruvad progesteroonile tundlikes stroomarakkudes paljud signaalirajad ning

transkriptsioonifaktorid, mis tähistab detsidualiseerumise algust (Brar *et al.* 1997; Gellersen ja Brosens 2003; Gellersen *et al.* 2007). Rakkudesse koguneb glükogeeni varu ning vedeliku hulk rakkude vahelises ruumis suureneb, mis põhjustab strooma tursumist (Wienke *et al.* 1968; More *et al.* 1974; Ferenczy ja Guralnicik 1983). Selle protsessi tulemusena eralduvad rakud üksteisest ning ka neid ümbritsev maatriks muutub, mis loob trofoblastide invasiooniks vajaliku keskkonna (Aplin *et al.* 1988).

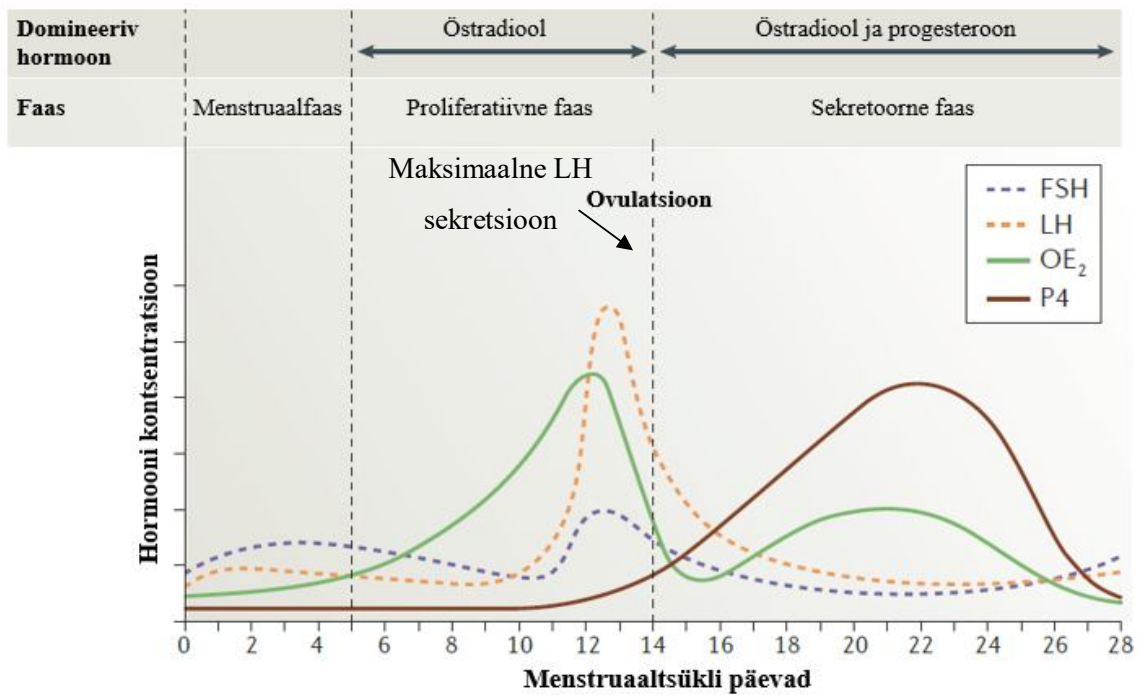
1.2. Menstruaaltsükkel

Viljakas eas naise emaka limaskest allub tsüklilistele muutustele. Seda ajavahemikku kutsutakse menstruaaltsükliks. Menstruaaltsükli jooksul toimuvad emaka limaskestas ümberkorraldused vastusena hüpotaalamuse, ajuripatsi ja munasarjade poolt toodetud hormoonidele. Menstruaaltsükli võib jagada kolmeks: menstruaalfaas, proliferatiivne faas ja sekretoorne faas (Joonis 1). Üldiselt loetakse tsükli pikkuseks 28 päeva alustades menstruatsioonist ning lõpetades järgmise tsükli esimese menstruatsiooni päevaga.

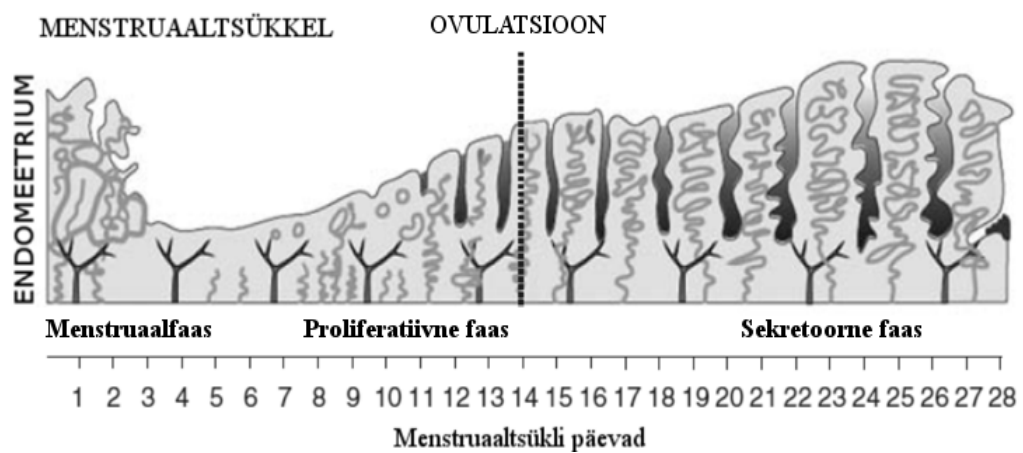
Proliferatiivne faas on östradiooli mõju all ning sekretoorne faas nii östradiooli kui progesterooni mõju all (Joonis 1A). Östradiool mõjutab luteiniseeriva hormooni (LH) sekretsiooni, mille järsk tõus kutsub esile ovulatsiooni.

Ovulatsiooni, mis leiab aset 35-44 tundi pärast LH sekretsiooni maksimumi, käigus vabaneb munarakk ning lõhkenud folliikulist areneb kollaskeha. Kollaskeha eritab progesterooni, mis on vajalik endomeetriumi säilitamiseks võimaliku viljastatud munaraku vastuvõtmiseks ning stroomarakkude detsidualiseerumise jaoks, mis inimestel toimub rasedusest sõltumata (Brar *et al.* 1997; Halasz ja Szekeres-Bartho 2013). 6-7 päeva pärast munaraku viljastamist algab blastotsüsti implantatsioon endomeetriummisse (Sarani *et al.* 1999). Kui puudub viljastatud munaraku kinnitumine, siis kollaskeha taandareneb, väheneb tsirkuleeriva östradiooli ja progesterooni tase ning endomeetriumi funktsionaalkiht irdub.

A:



B:



Joonis 1. (A) Menstruaaltsükli hormonaalne kontroll. FSH – folliikuleid stimuleeriv hormoon; LH – luteiniseeriv hormoon; OE_2 – östradiool; P4 – progesteroon. Modifitseeritud (Wira *et al.* 2015) järgi. (B) Endomeetriumi dünaamika menstruaaltsükli jooksul. Modifitseeritud (Aplin *et al.* 2008) järgi.

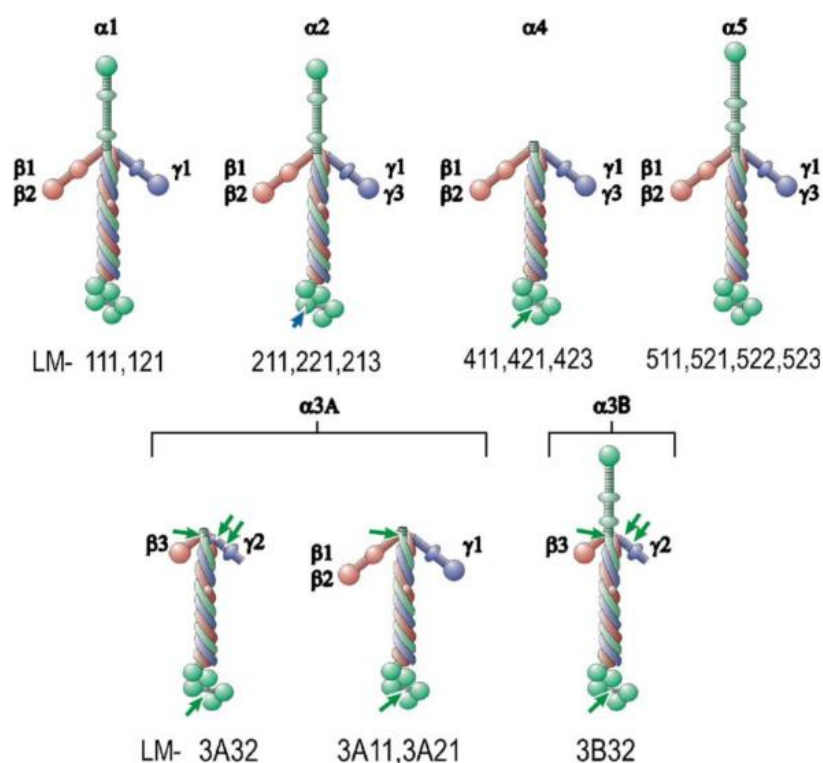
1.3. Rakuväline maatriks

Rakuväline maatriks on polüsahhariididest ja glükoproteiinidest moodustunud dünaamiline võrgustik, mis lisaks struktuursele omadusele tagab rakkudele omavaheliseks suhtluseks vajaliku keskkonna. Rakuvälise maatriksi valgud seostuvad rakupinnaretseptoritega, mõjutades erinevaid signaaliradasid (juktakriinne signalisatsioon). Lisaks sisaldab rakuväline maatriks kasvufaktoreid ning tema struktuur annab rakkudele koespetsiifilise fenotüübi. See tuleneb asjaolust, et rakuvälise maatriksi ümberkujundamise kaudu muutub tema funktsioon ning seeläbi ka temaga kontaktis olevate rakkude olek (Streuli 1999).

Rakuvälise maatriksi erivorm on basaalmembraan ehk basaalne laamina. Basaalmembraan paikneb epiteeli- ja endoteelirakkude kihi all. See koosneb laminiinidest, tüüp IV kollageenist, nidogeenist ja proteoglükaanidest ning temas eristatakse elektrontihedat kihti *lamina densa* ning hõredamat kihti *lamina lucida* (Yurchenco *et al.* 2012). Basaalmembraani moodustamine on mitmeetapiline protsess, mille algatab laminiinide seostumine rakkude pinnale (Smyth *et al.* 1999).

1.4. Laminiinid

Laminiinid on basaalmembraani struktuursed komponendid, mis kontrollivad rakkude adhesiooni, migreerumist, diferentseerumist, jagunemist ja ka resistentsust apoptoosile (Domogatskaya *et al.* 2012). Esimene kirjeldatud laminiini isovorm, laminiin-111 (Joonis 3), puhastati Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) kasvajas (Timpl *et al.* 1979) ning nüüdseks on teada 16 erinevat laminiini isovormi (Joonis 2). Need makromolekulid on heterotrimeersed tugevalt glükosüleeritud glükoproteiinid, mis koosnevad kolmest polüpeptiidahelast. Trimeerse laminiini kolme üksikahelat tähistatakse kreeka tähtedega ning seega koosneb iga laminiin α -, β - ja γ -alaühikust, mis kokkupõimunult moodustavad risti- või T-kujulise struktuuri (Joonis 3). Inimesel on praeguseks kirjeldatud viis erinevat α -, kolm β - ning kolm γ -ahelat (Aumailley *et al.* 2005)



Joonis 2. Inimese ja hiire laminiinde isovormid. Numbrid laminiinide (LM) all viitavad trimeeri moodustavatele ahelatele. $\alpha 3A$ -, $\alpha 4$ -, $\beta 3$ -, $\gamma 2$ -ahelatel esineb lühike õlg äralõigatud kujul, samas kui $\alpha 5$ ahela lühike õlg on pikem kui teistel α -ahelatel. Nööled näitavad ensüümide lõikamiskohti (Aumailley *et al.* 2005).

Laminiinidel on kaks või kolm ühest ahelast koosnevat lühikest õlga ning üks pikk kolmeahelaline keerd-keerd domeeniga õlg (Joonis 3). Iga laminiini ahel algab N-terminaalse globulaarse domeeniga (LN), millele järgneb tandemjärjestus laminiini epidermaalse kasvufaktori (EGF) sarnastest domeenidest (LE). Erinevalt teistest ahelatest on α -ahelal C-terminaalses otsas viis globulaarset domeeni (LG1-5) (Aumailley *et al.* 2005). On nädatud, et LN domeenid on vajalikud laminiinide trimeeri kokkupanekuks ja basaalmembraani ülesehitamiseks ning et selle domeeni puudumisel on ahela polümerisatsiooni aktiivsus vähenenud (Cheng *et al.* 1997). Sellegipoolest kaasatakse ka äralõigatud õlgadega laminiine basaalmembraani moodustamisesse, kasutades seostumiseks teisi rakuvälise maatriksi molekule ning rakupinnaretseptoreid (Miner ja Yurchenco 2004). Põhilised laminiinide retseptorid ja ligandid on integriinid, düstroglükaan, sündekaanid, hepariin, sulfatiidid, perlekaan, fibuliinid, nidogeen ja agriin (Durbeeej 2010).

1.5. Detsidualiseerumine

Detsidualiseerumise käigus toimuvad endomeetriumis retseptiivsuse saavutamiseks, trofoblastide invasiooni kontrollimiseks ning raseduse tekkeks vajalikud biokeemilised ja morfoloogilised ümberkorraldused. Sellega kaasneb aktiivne näärmete sekretsioon, angiogenees, leukotsüütide kogunemine koesse ning stroomarakkude diferentseerumine sekretoorseteks rakkudeks (Dunn *et al.* 2003). See progesteroonist sõltuv protsess algab hilises sekretoorses faasis spiraalarterite vahetus läheduses ja progresseerub kuni raseduseni, mil terve kude on detsidualiseerunud. Stroomarakud eralduvad üksteisest ning diferentseeruvad morfoloogiliselt eristuvateks ümmargusteks detsiduaalrakkudeks. Need rakud modelleerivad ümbritsevat maatriksit haarates endasse rakuvaheainet, mille tõttu suureneb ka rakusiseste fagosoomide ja lüsoosoomide arv (Cornille *et al.* 1985). Immunovärvimisel on näha näärmeepiteeli aluses basaalmembraanis tüüp IV kollageeni, laminiini ja heparaansulfaat proteoglükaani ning samu molekule on näha ka detsiduaalrakkude ümber moodustunud basaalmembraani sarnases struktuuris, mis lisaks eelnevale sisaldab ka fibronektiini (Iwahashi *et al.* 1996; Aplin *et al.* 1995; Aplin *et al.* 1988). Teadaolevalt on näärmealuse basaalmembraani koostises laminiinide alaühikud $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$ ja $\gamma 1$. Detsiduaalrakke ümbritsevas kihis on leitud laminiinide alaühikuid $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ (Aplin *et al.* 1995; Church *et al.* 1997). Endometrioosi uuringutega on kirjeldatud endomeetriumis ka laminiini $\gamma 2$ -ahelate ekspressiooni (Giannelli *et al.* 2007; Locci *et al.* 2013). Laminiinid ekspresseeruvad stroomarakkude ümber alles siis kui sinna moodustub basaalmembraani sarnane struktuur detsidualiseerumise käigus (Faber ja Wewer 1986; Aplin *et al.* 1988). Raseduse puudumisel irdub detsidualiseerunud kude menstruatsiooni käigus, et saaks areneda uus funktsionaalne kiht, mis võimaldaks blastotsüsti implanteerumist.

1.6. Loote implanteerumine

Loote emakasiseseks arengus on vajalik blastotsüsti implanteerumine retseptiivsesse endomeetriumisse. Selleks läbivad endomeetriumi stroomarakud terminaalise diferentseerumise detsiduaalrakkudeks. Blastotsüsti implanteerumise protsessi võib jagada kolme etappi: apositsioon, adhesioon ning invasioon, mille käigus toimub vastavalt blastotsüsti esmane kontakt endomeetriumi valendikku voodertavate epiteelirakkudega, neile kinnitumine ning sissetung endomeetriumi stroomasse (Schlafke ja Enders 1975). Endomeetrium on

blastotsüstile vastuvõtlik 6-10 päeva pärast LH kontsentratsiooni järsku tõusu (Bergh ja Navot 1992). Seda vahemikku kutsutakse implantatsiooni aknaks.

Toimub nii blastotsüsti- kui ka emapoolne suhtlus hormoonide ning tsütokiinide vahendusel, et tagada edukas implanteerumine (Cross *et al.* 1994). Invasioonil peavad ema vereringeni jõudmiseks ja platsenta moodustamiseks trofoblasti rakud läbima epiteelialuse basaalmembraani ning detsiduaalrakkude vahelise matriksi. Selleks kasutavad rakud adhesioonimolekule, ekstratsellulaarse matriksi valke ning matriksi metalloproteinaase. Nendel sissetungivatel rakkudel on näidatud tüüp IV kollageennaasset aktiivsust, mis on suurim pesastumise hetkel. Tüüp IV kollageenaas lagundab detsiduas rakkude vahelist tüüp IV kollageeni, et võimaldada trofoblastide liikumist. Selle ekspressiooni võimendab matriksis leiduv laminiin, mille kasutamine IVF protseduuril võib suurendada tervete ja võimekate embrüote arenemist (Turpeenniemi-Hujanen *et al.* 1992).

Trofoblastide interaktsioone rakuvaheainega ning laminiiniga vahendavad trofoblastidel ekspresseeruvad integriinid. Integriinide, tüüp IV kollageeni- ja laminiinirikka ekstratsellulaarse matriksi vahelised kontaktid on vajalikud trofoblastide migreerumiseks. Migreerumise võimaldamiseks implantatsioonil toimuvad muutused trofoblastide integriinide ekspressioonis (Sutherland *et al.* 1993; Cross *et al.* 1994). Põhjalikud andmed laminiinide koostisest ning selle muutustest puuduvad. Matriksi retseptorite ja proteaaside ekspressioon pole tagatud kindla programmi järgi, vaid nõuab vastavat stimulatsiooni matriksilt, seega paljud retseptorid ilmnevad vastusena matriksilt saadud signaalile (Schultz ja Armant 1995). See näitab, et implanteerumise protsessi mõistmiseks on vaja põhjalikult teada rakuvaheaine koostist ning selle võimalikku rolli geeniekspressiooni kontrollis.

Ebaõnnestunud trofoblastide invasiooni tagajärjel võib välja kujuneda preeklampsia. Preeklampsia puhul on tsütotrofoblastide sissetungimine pindmine ning emaka arterioolidesse ligipääs puudulik. Integriinide ekspressioonis ei toimu vajalikke muutusi, mistõttu on takistatud trofoblastide liikumine (Zhou *et al.* 1993). Lisaks on preeklampsia uuringutega näidatud, et laminiini vastased antikehad inhibeerivad trofoblastide seostumist basaalmembraani kollageeniga (Foidart *et al.* 1986).

1.7. Endometrioos

Endometrioos on haigus, kus endomeetriumi omased rakud moodustavad emakaväliseid koldeid, mis põhjustavad naistel valu ning viljatust. Endometrioosi käigus moodustunud kude allub samuti tsüklilistele muutustele ning irdub menstruatsiooni käigus (Kitawaki *et al.* 2003).

Endometrioosi tekkepõhjus pole tänaseni veel selge, kuid üheks levinud teooriaks on implantatsiooniteooria, mille kohaselt äraspidisel menstruatsioonil endomeetriumi irdunud rakud liiguvad kõhuõõnde ning kinnituvad seal asuvatele organitele (Sampson 1927).

Endomeetriumi pärinevad rakud kinnituvad kõhukelme pinnale ning tungivad rakuvälisesse maatriksisse, kus nad jagunevad ning moodustavad endometrioosikoldeid. Olgugi, et endometrioosikolded ja normaalne endomeetrium on histoloogiliselt sarnased, on nende adhesioonimolekulid, proteolüütiliste ensüümide koosseis ning steroidide ja tsütokiinide süntees erinevad (Sharpe-Timms 2001). *In vitro* katsete abil on leitud, et endometrioosi stroomarakkudel (ECSC) on kõrgem adhesioonivõime kui normaalsetel endomeetriumi stroomarakkudel (NESC) ning ainult ECSC rakud suudavad kinnituda laminiinile (Adachi *et al.* 2011). Arvatakse, et ECSC rakkude suurenenud kinnitumisvõime on vastus spetsiifilistele rakuvälise maatriksi komponentidele (Klemmt *et al.* 2007). Siinkohal tuleb märkida, et kõhukelme basaalmembraan koosneb tüüp I ja tüüp IV kollageenist, laminiinidest ja fibronektiinist (Witz *et al.* 2001)

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö üheks eesmärgiks oli uurida laminiini ahelate ekspressiooni inimese endomeetriumi kartsinoomi rakuliinides RL95-2 ja HEC-1-A ning võrrelda seda nende ekspressiooniga normaalse endomeetriumi epiteelirakkudes. Varasemate tööde tulemuste põhjal võib väita, et mõnede näitajate osas vastavad eelpoolnimetatud rakuliinid kas siis retseptiivse endomeetriumi (RL95-2) või mitteretseptiivse (HEC-1-A) endomeetriumi koele (Kuramoto *et al.* 1972; Rohde ja Carson 1993; John *et al.* 1993). Eksperimentaalse töö esimeses osas uurisime laminiini ahelate ekspressiooni nende rakuliinide rakulüsaatides ning nende poolt moodustatud rakuvälises maatriksis.

Töö teises pooles pühendusime laminiinide ekspressiooni uurimisele primaarsetes endomeetriumi eraldatud strooma- ja epiteelirakkudes (Tartu Ülikooli inimuuringu eetikakomitee luba nr 221/M-31), kuivõrd need rakud vastavad palju rohkem normaalsetele endomeetriumi rakkudele kui seda on kartsinoomirakud. Võimalikud erinevused ahelate ekspressioonis võivad mõjutada endomeetriumi retseptiivsust. Töö viimases osas oli meie eesmärgiks uurida laminiini ahelate ekspressiooni dünaamikat endomeetriumi koes menstruaaltsükli jooksul.

Eelnevast lähtuvalt püstitati järgmised ülesanded:

- 1) Uurida laminiini ahelate ekspressiooni endomeetriumi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A lüsaadis
- 2) Uurida laminiinide ekspressiooni rakuliinide ning stroomarakkude poolt toodetud rakkudevälises maatriksis
- 3) Võrrelda laminiini ahelate ekspressiooni retseptiivse (RL95-2) ja mitteretseptiivse (HEC-1-A) rakuliini ning normaalse endomeetriumi epiteelirakkudega.
- 4) Kirjeldada laminiini ahelate ja isovormide ekspressiooni stroomarakkudes
- 5) Uurida laminiini ahelate dünaamikat endomeetriumi sekretoorse faasi jooksul

Materjalid ja meetodika

2.1.1. Kasutatud antikehad

Tabel 1. Immuunlaigutuse analüüsil kasutatud primaarsed antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Inimese laminiini $\alpha 1$ - ahela vastane küüliku PAK H-300	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\alpha 2$ – ahela vastane hiire MAK B-4	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\alpha 3$ -ahela vastane küüliku PAK H-187	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\alpha 4$ -ahela vastane hiire MAK 8C10	S. Ingerpuu ja E. Juronen, Eesti	1 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\alpha 5$ -ahela vastane hiire MAK 4B5	S. Ingerpuu ja E. Juronen, Eesti	2,45 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\beta 1$ -ahela vastane hiire MAK DG10	I. Virtanen, Soome	2,9 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\beta 2$ -ahela vastane hiire MAK C4	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\beta 3$ -ahela vastane küüliku PAK H-300	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\gamma 1$ -ahela vastane hiire MAK D-3	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\gamma 2$ -ahela vastane küüliku PAK H-183	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini $\gamma 3$ -ahela vastane kitse PAK C-19	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Hiire IgG isotüüpide segu MG1-45 ja MPC-11	Abcam, UK	0,5 mg/0,5 ml	1:1000
Inimese aktiini vastane küüliku PAK I-19	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,1 mg/ml	1:2500

MAK – monoklonaalne antikeha, PAK – polüklooraalne antikeha.

Tabel 2. Immuunlaigutus analüüsil kasutatud sekundaarsed antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Hiire IgG vastane HRP-konjugeeritud kitse PAK sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/0,5 ml	1:5000
Küüliku IgG vastane HRP-konjugeeritud kitse PAK sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/0,5 ml	1:5000
Kitse IgG vastane HRP-konjugeeritud eesli PAK sc-2020	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/0,5 ml	1:5000

HRP – mädarõika peroksüdaas. PAK – polükloonaalne antikeha.

Tabel 3. Immuunsadestamisel ja järgneval immuunlaigutusel kasutatud antikehad

Antikeha	Firma/autor, riik	Algkontsentratsioon	Kasutatud lahjendus
Inimese laminiini β 1-ahela vastane hiire MAK DG10	I. Virtanen, Soome	2,9 mg/ml	2 μ g/ml
Hiire MAK IgG1 MG1-45	Abcam, UK	0,5 mg/0,5 ml	2 μ g/ml
Inimese laminiini α 1 - ahela vastane küüliku PAK H-300	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini α 3-ahela vastane küüliku PAK H-187	Santa Cruz Biotechnology, USA	0,2 mg/ml	1:500
Inimese laminiini α 4-ahela vastane hiire MAK 8C10	S. Ingerpuu ja E. Juronen, Eesti	1 mg/ml	1:500
Inimese laminiini α 5-ahela vastane hiire MAK 4B5	S. Ingerpuu ja E. Juronen, Eesti	2,45 mg/ml	1:500

MAK – monokloonaalne antikeha, PAK – polükloonaalne antikeha.

2.1.2. Kasutatud rakud ja koeproovid

Käesolevas töös kasutatud primaarsed endomeetriumi strooma- ja epiteelirakud ning koeproovid on saadud Tervisetehnoloogiate Arenduskesusest, kellel on nende eraldamiseks ning uurimiseks Tartu Ülikooli inimuuringute eetikakomitee luba nr 221/M-31. Uuringus osalenud naised allkirjastasid enne koeproovi võtmist informeeritud nõusoleku vormi.

Primaarsed stroomarakud on eraldatud terve naise endomeetriumi biopsiast 8 päeva pärast LH järsku tõusu vastates seega keskmise sekretoorse faasi retseptiivsele endomeetriumile.

Primaarsed epiteelirakud on eraldatud terve naise endomeetriumi menstruaaltsükli 19. päeval vastates seega keskmise sekretoorse faasi retseptiivsele endomeetriumile ja lüüsitud 1.-2. passaaži järel.

Koeproovid on tehtud lüüsitud endomeetriumi biopsiast 2, 8, 9 päeva pärast LH järsku tõusu (vastavalt LH+2, LH+8, LH+9, kus LH+1 loetakse ovulatsiooniks). LH+2 proovid vastavad varajase sekretoorse faasi endomeetriumile ning LH+8 ja LH+9 keskmise sekretoorse faasi endomeetriumile langedes kokku endomeetriumi retseptiivse faasiga. Koeproovid saadi juba lüüsitud kujul.

Töös kasutati kahte inimese endomeetriumi kartsinoomi rakuliini RL95-2 ning HEC-1-A. Varasemates uuringutes on näidatud, et inimese trofoblastide rakuliini JAR rakud kinnituvad märkimisväärselt tugevamalt RL95-2 rakkudele kui HEC-1-A rakkudele (Rohde ja Carson 1993; Harduf *et al.* 2007). Seega võiksid RL95-2 rakud sarnaneda retseptiivse endomeetriumi rakkudele tunduvalt rohkem kui HEC-1-A rakud, mis esindavad pigem mitteretseptiivset endomeetriumit.

2.1.3. Rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A kasvatamine

RL95-2 rakke kasvatati DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Ham's F-12) söötmes (Lonza, Belgia), kuhu oli lisatud 10% FBS-i. Söötmesse lisati ka inimese insuliini (Invitrogen, USA) 5 µg/ml. HEC-1-A rakke kasvatati McCoy's 5A söötmes (Corning cellgro, USA), kuhu oli lisatud 10% FBS-i. Mõlemasse söötmesse lisati ka 100 U/ml penitsilliini (Sigma-Aldrich, USA) ja 100 µg/ml streptomütsiini (Sigma-Aldrich, USA). Kõiki rakke kasvatati 5% CO₂ juuresolekul veeauruga küllastatud atmosfääris temperatuuril 37°C. Rakkude ümberkülvamiseks pesti neid kaks korda steriilse 1×PBS-iga ning eemaldati plastikult trüpsiiniga. Trüpsiini mõju inhibeeriti, lisades trüpsiini lahusega võrdses mahus söödet. Rakud

sadestati tsentrifuugides (tsentrifuug 4-16K, Sigma, Saksamaa) 10 minuti jooksul 300×g ja 20° C juures. Rakke passeeriti 2-3 päeva järel, mil nad olid saavutanud 90%-100%-lise konfluentsuse.

2.1.4. Rakkude lüüsimine ja rakuvälise maatriksi eraldamine

Kartsinoomirakuliinide rakud eemaldati Petri tassilt 10mM EDTA-ga PBS-is. Seejärel sadestati rakud tsentrifuugides (tsentrifuug 4-16K, Sigma, Saksamaa) 10 minutit 399×g ja 4°C juures. Pärast eemaldati supernatant ning rakud suspendeeriti 1×PBS-is, misjärel pesti kaks korda 1×PBS-ga. Lüüsimiseks inkubeeriti rakke Burgeson'i poolt modifitseeritud RIPA lüüsipuhvris (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,3% NP-40, Triton X-100, Na-deoksükolaat, 0,1% SDS), millele lisati PMSF ja proteaaside inhibiitorite segu (Roche Diagnostics GmbH, Šveits) 45 minuti jooksul jääl. Inkubatsiooni ajal töödeldi rakke 3×15 sekundit ultraheliga ning saadud lüsaati tsentrifuugiti (5415R Eppendorf, Saksamaa) 10 minutit 16000×g ja 4°C juures. Supernatant säilitati -20°C juures.

Petri tassid, millelt eelnevalt eemaldati rakud, pesti kolm korda PBS-ga. Maatriksi eraldamise ajal hoiti tase jääl ning nendesse lisati Burgeson'i RIPA lüüsipuhvrit. Maatriksi valgud, mis eemaldati tassidelt mehhaaniliselt säilitati supernatant -20°C juures.

Sama meetodiga lüüsi ja eraldati ettekasvatatud stroomarakud 7. passaaži järel.

2.1.5. Rakuvälise maatriksi valkude segu kontsentreerimine

Stroomarakkude ja kartsinoomirakuliinide eraldatud maatriksi valkude kontsentreerimiseks mahutati lüsaadid 6-8 kDa läbilaskepiiriga Spectra/POR dialüüsimembraani (Spectrum Laboratories, USA), mis asetati polüetüleenglükooli 40000 (SERVA, Saksamaa) ja hoiti kuni piisavalt vedelikku oli välja imendunud. Kontsentreeritud valkude segu dialüüsiti 50mM Tris-HCl puhvri (pH=7,5) vastu üleöö.

2.1.6. Valkude kontsentratsiooni mõõtmine

Valkude kontsentratsioon rakulüsaatides ning maatriksi valkude segus määrati spektrofotomeetriliselt (Multiskan Ascent Type 354, Thermo Electron Corporation, USA) kasutades bitsinkoonhappel (BCA) põhinevat Pierce BCA Protein Assay Kit'i (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) tootja protokoll järgi (nr 23227).

2.1.7. SDS-polüakrüülamiidgeelelektroforees ja immuunlaigutus analüüs

Valkude denatureerimiseks rakulüsaatides ja maatriksi valkude segus lisati kuue- või kahekordset Laemmli proovipuhvrit koos DTT-ga disulfiidsildade redutseerimiseks ning kuumutati 5 minutit 100°C juures. Valkude lahutamiseks SDS-polüakrüülamiidgeelil kasutati strooma- ning epiteelirakkude korral 6% geeli ning koe lüsaadi puhul 4%-10% gradientgeeli. Valkude molekulmasside markerina kasutati Spectra Multicolor High Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Leedu) markerit. Valgud kanti geelilt märgülekandega PVDF (polüvinülideenfluoriid; Immobilon, Millipore, USA) membraanile 1 tunni jooksul pingel 100 V. Antikehade ebaspetsiifilise seondumise vältimiseks blokeeriti membraane tund aega loksutil blokeerimissegus (1×PBS, 0,1% Tween 20, 5% lõssipulber). Membraane pesti 1×PBS-ga, milles oli 0,1% Tween 20, 10 minutit loksutil. Primaarsete antikehadega töötlemiseks inkubeeriti membraane tund aega blokeerimissegus koos antikehadega (Tabel 1). Seejärel pesti membraane loksutil kolm korda 15 minutit 1×PBS-ga, mis sisaldas 0,1% Tween 20, ning inkubeeriti tund aega blokeerimissegus, kuhu lisati sekundaarsed antikehad (Tabel 2). Antikehade seostumise tuvastamiseks kasutati kemiluminesentsi esilekutsuvad komplekti (Immobilon Western, Millipore, USA) vastavalt tootja protokollile (nr P36599). Membraane inkubeeriti reaktsioonisegus 5 minutit. Saadud signaal visualiseeriti pimikus röntgenfilmile (Agfa, Belgia).

2.1.8. Rakulüsaatide ja rakuvälise maatriksi valkude immuunsadestamine

Immuunsadestamisel kasutati Dynabeads M-280 polüstüreenkerakesi (Invitrogen Dynal AS, Norra), mille külge olid kovalentselt seotud hiire IgG vastased lamba polükloonaalsed antikehad. Immuunsadestamine teostati vastavalt tootja protokollile (112.01D), kus kerade lõppmaht reaktsioonisegus oli 2×10^7 kera/ml, milledega seoti nelja tunni jooksul 4°C juures rotaatoril laminiini β 1-ahela vastased antikehad ning negatiivse kontrolli tarbeks hiire IgG-d (Tabel 3), mida 10^7 kerakese kohta lisati 1 µg. Pesupuhvrina kasutati 1×PBS-i, mis sisaldas 0,1% BSA-d ja 2mM EDTA-d. Kerasid inkubeeriti uuritavate valgulahustega 16 tundi rotaatoril 4°C juures.

2.1.9. Varemkinnitunud antikehade eemaldamine PVDF membraanilt

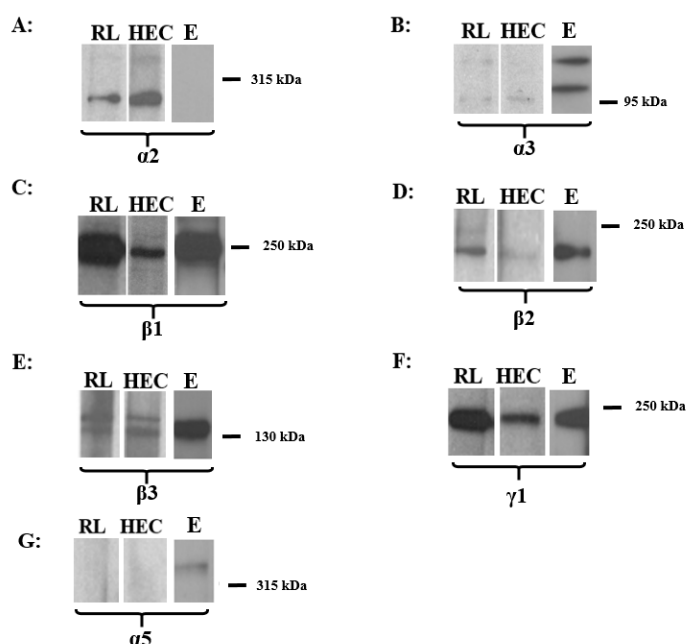
Kui immuunlaigutus analüüsil kasutati PVDF membraane mitmekordselt, siis eemaldati nendelt eelnevalt seostunud antikehad. Selleks pesti membraane 3×15 minutit 1×PBS-is, mis

sisaldas 0,1% Tween 20. Antikehade eemaldamiseks inkubeeriti membraane 2×10 minutit loksutades nn „mild stripping“ puhvris (1,5% glütsiin, 0,5% SDS, 1% Tween 20) toatemperatuuril. Sellele järgnes 2×10 minutit pesu 1×PBS-is ning üks viieminutiline pesu 1×PBS-is, mis sisaldas 0,1% Tween 20. Seejärel inkubeeriti membraane üks tund blokeerimissegu (1×PBS, 0,1% Tween 20, 5% lõssipulber). Membraane pesti uuesti 3×15 minutit 1×PBS-is, mis sisaldas 0,1% Tween 20.

2.2. Tulemused

2.2.1. Laminiini ahelate ekspressioon rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A rakkudes ning normaalse endomeetriumi epiteelirakkudes

Valkude elektroforeetilisel lahutamisel kasutasime 6% polüakrüülamiidgeeli ja kuuekordset proovipuhvrit redutseeritud tingimustes (vt „Materjal ja meetodika“). Analüüsil kasutatud laminiini α 1-, α 2-, α 3-, α 5-, β 1-, β 2-, β 3-, γ 1-, γ 2-ahelate vastased primaarsed antikehad on toodud Tabelis 1 ja sekundaarsed antikehad Tabelis 2. Negatiivseks kontrolliks kasutasime Tabelis 1 toodud hiire IgG isotüüpide segu, mille immuunlaigutuse tulemusi pole joonisel esitatud. Valkude koguhulga proovides võrdsustasime kõige väiksema valguhulgaga proovi suhtes.

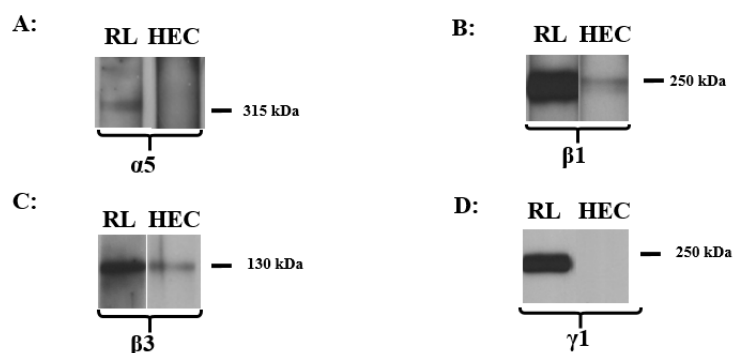


Joonis 4. RL95-2 (RL), HEC-1-A (HEC) rakuliinide rakkude ja epiteelirakkude (E) lüsaatide immuunlaigutus analüüs. Laminiini ahelad: (A) α 2-ahel; (B) α 3-ahel; (C) β 1-ahel; (D) β 2-ahel; (E) β 3-ahel; (F) γ 1-ahel; (G) α 5-ahel. RL95-2 ja HEC-1-A rakkude lüsaadid on valgu üldhulga suhtes võrdsustatud.

Katsete tulemustest selgus, et mõlemad rakuliinid sünteesivad laminiini $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelaid, kuid $\alpha 5$ -, $\alpha 1$ -, $\gamma 2$ -ahelate (Joonis 4) (viimased kaks pole joonisel toodud) ekspressiooni ei tuvastatud. Samade rakuliinide maatriksis tuvastasime immuunlaigutus analüüsiga laminiini $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, $\gamma 1$ - ja erinevalt lüsaatidest ka $\alpha 5$ -ahelate olemasolu RL95-2 rakkude puhul (Joonis 5), kuid ei tuvastanud $\gamma 1$ -, $\alpha 5$ -ahela sekretsiooni HEC-1-A rakkude poolt. Mitte kvantitatiivseks võrdluseks on RL95-2 ja HEC-1-A rakkude lüsaatide immuunlaigutuse tulemused kõrvutatud normaalse endomeetriumi epiteelirakkude lüsaadi immuunlaigutuse tulemustega.

2.2.2. Laminiini ahelate ekspressioon rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A rakuvälises maatriksis

Meid huvitas ka, kas RL95-2 ja HEC-1-A rakud sekreteerivad rakuvälisesse maatriksisse nende poolt toodetud laminiine ning kas nende valkude omavaheline suhteline hulk on sama, mida me nägime rakulüsaatides. Selleks, analüüsisime RL95-2 ja HEC-1-A rakkude poolt moodustunud maatriksi valkude segu ning tuvastasime selles laminiini ahelate olemasolu (Joonis 5). Katse tingimused olid samad, mis rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A lüsaatide puhul. Valkude üldhulk rakulüsaatides võrdsustati kõige väiksema valguhulgaga preparaadi suhtes.



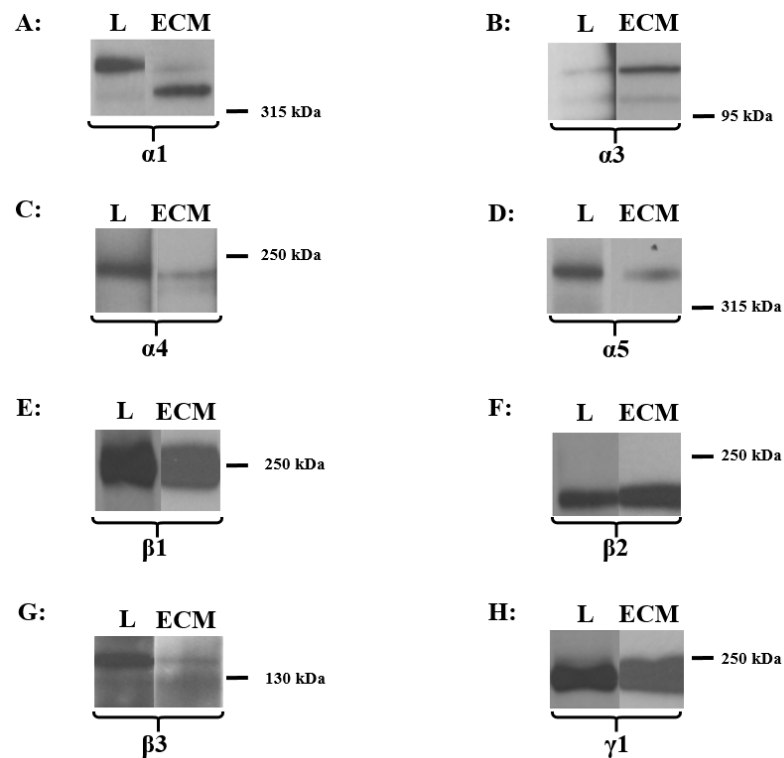
Joonis 5. RL95-2 (RL) ja HEC-1-A (HEC) rakuliinide rakkude maatriksi valkude immuunlaigutus. Laminiini ahelad: (A) $\alpha 5$ -ahel; (B) $\beta 1$ -ahel; (C) $\beta 3$ -ahel; (D) $\gamma 1$ -ahel.

Selgus, et nii nagu RL95-2 ja HEC-1-A rakkude lüsaatide (Joonis 4C) puhul, esineb nende rakkude poolt moodustatud maatriksis rakuliinide vaheline laminiini $\beta 1$ -ahelate kvantitatiivne

erinevus (Joonis 5B). Laminiini β 3-ahelad ekspresseeruvad mõlemas rakuliinis (Joonis 5C), Väärib tähelepanu, et erinevalt rakulüsaatidest, kus β 3-ahela puhul on näha kahte valku, on maatriksi valkude puhul näha tõenäoliselt üksnes väiksema molekulmassiga proteolüüsitud vormi. Huvitav on asjaolu, et laminiini γ 1-ahel on RL95-2 rakuvälises maatriksis tugevalt esindatud, kuid HEC-1-A rakuvälises maatriksis ta puudub, kuigi rakulüsaadis on ta olemas (Jooniseid 4F ja 5D). Laminiini α 5-ahel on näha normaalsete epiteelirakkude lüsaadis ja RL95-2 rakkude rakuvälises maatriksis (Joonised 4G ja 5A) kuid puudub nii HEC-1-A rakkude lüsaadist kui ka nende rakkude poolt sekreteeritud maatriksist (Jooniseid 4G ja 5A). Asjaolu, et laminiini α 5-ahel on küll olemas RL95-2 rakkude rakuvälises maatriksis, aga pole tuvastatav samade rakkude lüsaadist on seletatav sellega, et α 5-ahela hulk neis rakkudes on madal. Enne analüüsi kontsentreerisime rakuvälise maatriksi valkude segu märkimisväärselt, mis ilmselt tõstis laminiini α 5-ahela hulga tuvastamise piirist kõrgemale.

2.2.3. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi stroomarakkudes ning nende rakuvälises maatriksis

Selleks, et uurida, millised laminiini ahelad ekspresseeruvad inimese endomeetriumi stroomarakkudes ning nende poolt moodustatud rakuvälises maatriksis, kasutasime rakulüsaatide ja maatriksi valkude segu lahutamiseks immuunlaigutus meetodil samu tingimusi nagu eelnevalt kirjeldatud. Stroomarakkude kontsentreeritud maatriksi valkude segule lisati kahekordset proovipuhvrit. Katses kasutatud primaarsed antikehad on esitatud Tabelis 1 ja sekundaarsed antikehad Tabelis 2. Negatiivse kontrollina kasutasime hiire IgG isotüüpide segu, mille reaktsioone pole joonisel esitatud. Valkude üldhulk rakulüsaatides ja maatriksi valkude segus ei ole omavahel võrdsustatud.

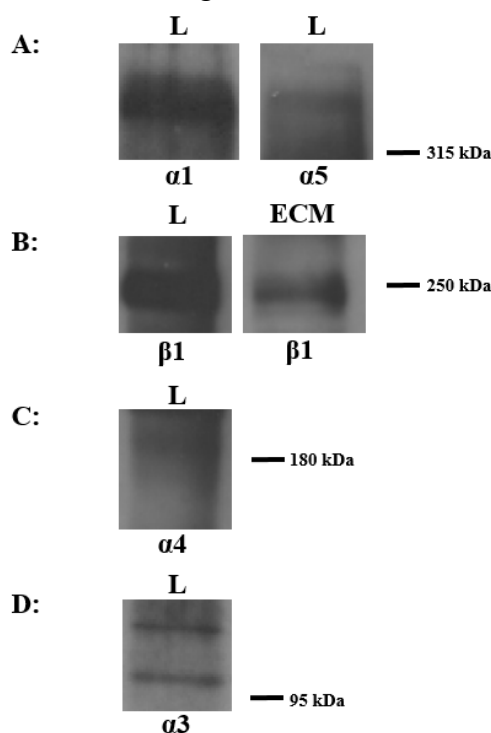


Joonis 6. Stroomarakkude lüsaadi (L) ja nende rakkude poolt moodustatud rakuvälise maatriksi (ECM) immuunlaigutus. Laminiini ahelad: (A) $\alpha 1$ -ahel; (B) $\alpha 3$ -ahel; (C) $\alpha 4$ -ahel; (D) $\alpha 5$ -ahel; (E) $\beta 1$ -ahel; (F) $\beta 2$ -ahel; (G) $\beta 3$ -ahel; (H) $\gamma 1$ -ahel.

Immuunlaigutuse analüüsi tulemustest (Joonis 6) on näha, et nii stroomarakkudes kui ka nende poolt moodustatud maatriksis ekspresseeruvad laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelad. Selgus, et laminiini $\alpha 1$ -ahela (Joonis 6A) puhul on rakulüsaadis täheldatav eelkõige täispikk valk, samas kui maatriksis esineb suure tõenäosusega selle proteolüüsitud fragment. Ka laminiini $\alpha 4$ -ahela (Joonis 6C) puhul on stroomarakkude lüsaadis tuvastatav täispikk valk, kuid maatriksis esineb lisaks täispikale valgule väga lähedase, kuid väiksema molekulmassiga valgu fragment. Laminiini $\alpha 3$ -ahela (Joonis 6B) puhul on nii stroomarakkude lüsaadis kui ka maatriksi valkude segus tuvastatavad kaks proteolüütilist fragmenti, kuid puudub täispikk molekul. Sama võib väita ka laminiini $\beta 3$ -ahela (Joonis 6G) kohta, kus nii rakulüsaadis kui ka maatriksis esinevad selle ahela erineva suurusega fragmendid.

2.2.4. Laminiini trimeersete isovormide ekspressioon inimese endomeetriumi stroomarakkudes ning rakuvälises maatriksis

Selleks, et immuunsadestada inimese endomeetriumi stroomarakkude ja nende poolt moodustatud maatriksi valkude segust $\beta 1$ -ahelat sisaldavaid trimeerseid laminiinide isovorme, kasutasime laminiini $\beta 1$ -ahela vastast hiire monoklonaalset antikeha. Immuunsadestatud valgud lahutasime 6%-lise SDS-poliakrüülamiidgeelelektroforeesi teel redutseeritud tingimustes. Valkude tuvastamiseks kasutasime immuunlaigutus meetodit. Kasutatud primaarsed ja sekundaarsed antikehad on toodud vastavalt Tabelis 3 ja 2. Negatiivseks kontrolliks kasutasime sadestamisel hiire IgG1.



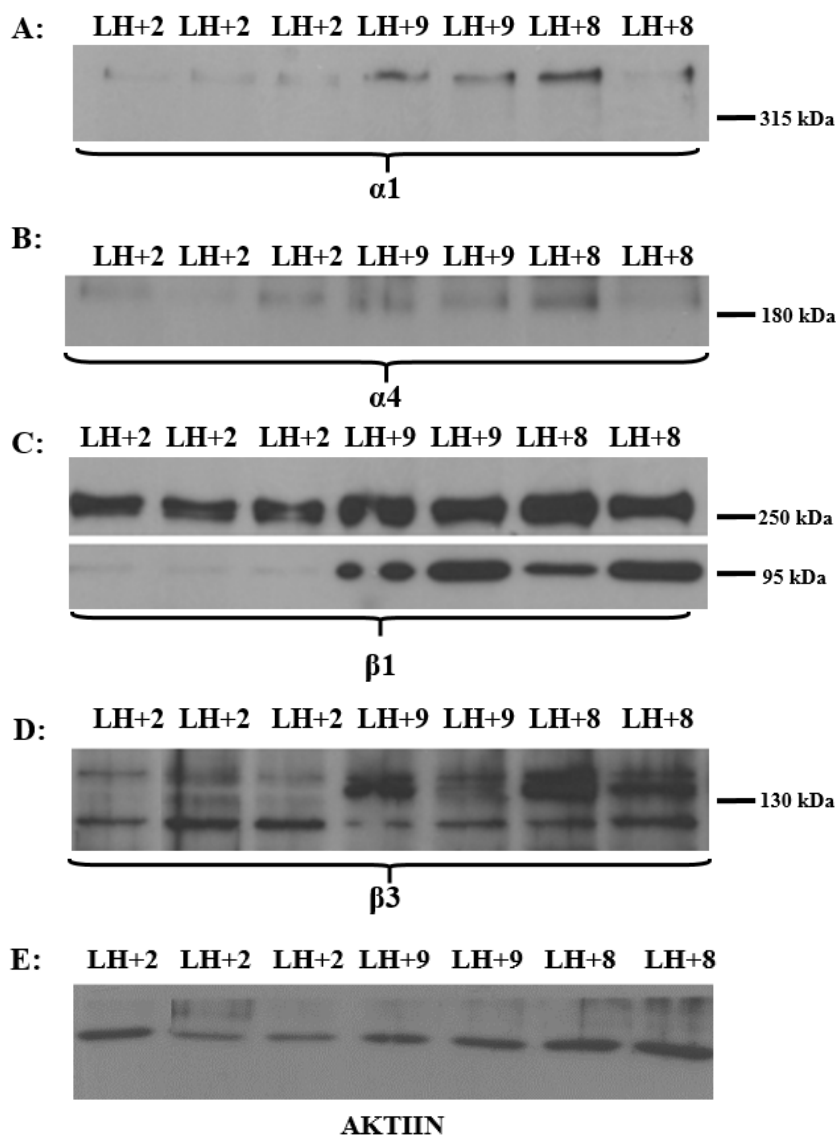
Joonis 7. Inimese endomeetriumi stroomarakkude lüsaadi (L) ja rakuvälise maatriksi (ECM) valkude segu immuunsadestamisel saadud materjali immuunlaigutuse analüüs. Immuunsadestamiseks kasutati laminiini $\beta 1$ -ahela vastast hiire monoklonaalset antikeha DG10. Laminiini ahelad: (A) $\alpha 1$ - ja $\alpha 5$ -ahel; (B) $\beta 1$ -ahel; (C) $\alpha 4$ -ahel; (D) $\alpha 3$ -ahel.

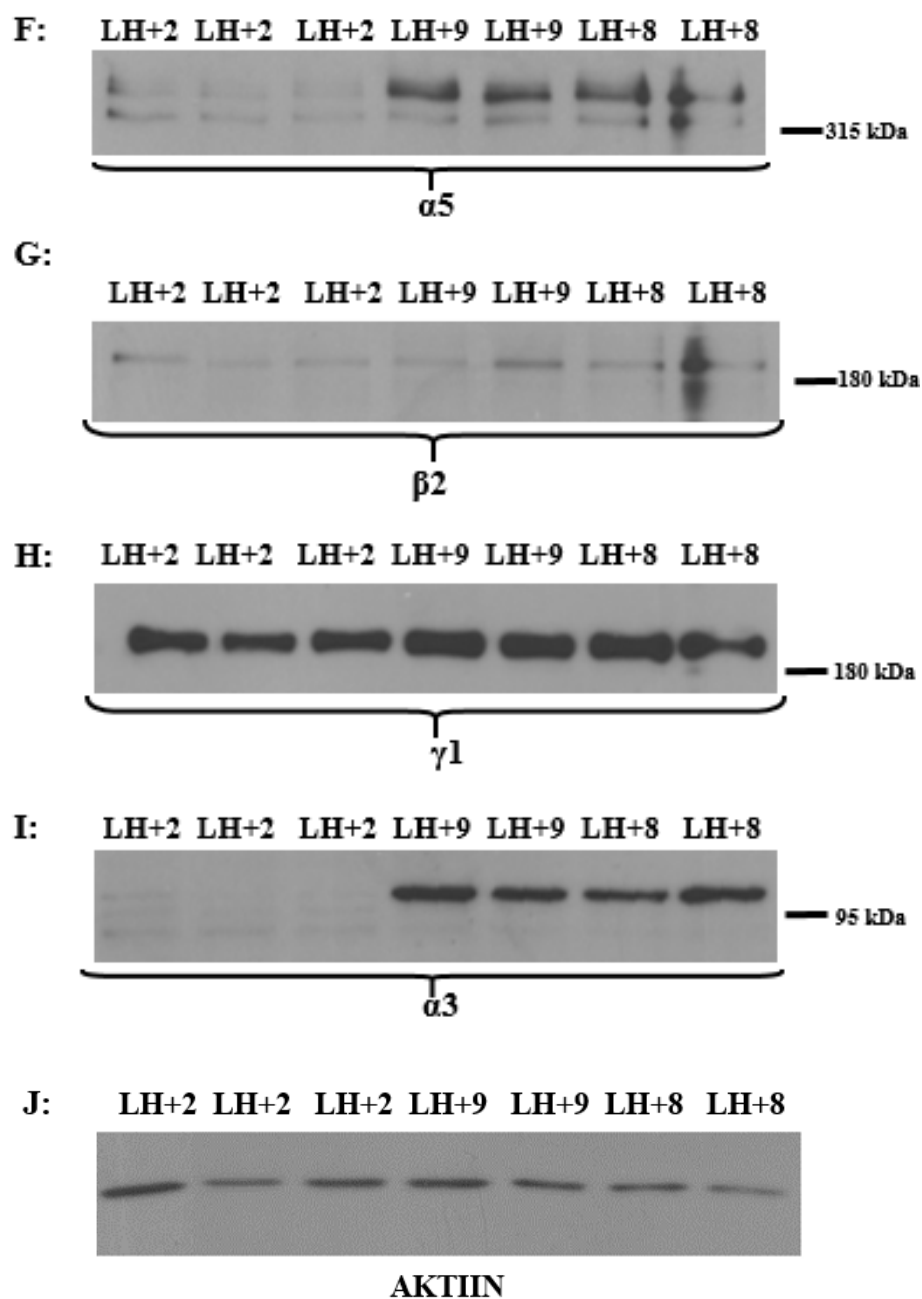
Asjaolu, et laminiini $\beta 1$ -ahela vastase antikehaga sadestus nii rakulüsaadist kui ka rakuvälise maatriksi valkude segust välja $\beta 1$ -ahel, näitab et immuunsadestamine õnnestus. Veel enam, $\beta 1$ -ahelaga koos sadestusid rakulüsaadist välja veel ka laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ -, $\alpha 4$ - ja $\alpha 3$ -ahelad (Joonis 7). Siinkohal tuleb märkida, et sarnaselt varasemate tulemustega sadestus laminiini $\beta 1$ -

ahelatega koos välja laminiini $\alpha 3$ -ahela kaks erisuguse molekulmassiga fragmenti (Joonis 7D). Rakuvälise maatriksi valkude segust õnnestus meil sadestunud materjalis tuvastada üksnes laminiini $\beta 1$ -ahela olemasolu (Joonis 7B)

2.2.5. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi koes

Inimese endomeetriumi koe lüsaadis olevate valkude lahutamiseks kasutasime 4%-10% SDS-polüakrüülamiid gradientgeeli redutseeritud tingimustes. Immuunlaigutus analüüsil kasutatud primaarsed laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ -, $\gamma 1$ -ahelate vastased antikehad ja sekundaarsed antikehad on toodud vastavalt Tabelis 1 ja Tabelis 2. Valkude üldhulk geelile kantavates valguproovides on võrdsustatud ning selle kinnituseks kasutasime aktiini vastast antikeha (Tabel 1).



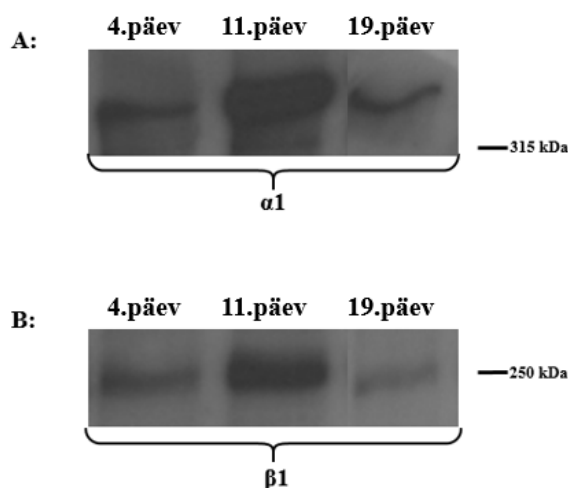


Joonis 8. Inimese endomeetriumi koe lüsaatide immuunlaigutus. LH+2, LH+8, LH+9 – vastavalt 2, 8, 9 päeva pärast luteiniseeriva hormooni järsku tõusu, kus LH+1 loetakse ovulatsiooniks. LH+2 kirjeldab varajast sekretoorset faasi ning LH+8 ja LH+9 retseptiivset faasi. Laminiini ahelad: (A) $\alpha 1$ -ahel, (B) $\alpha 4$ -ahel, (C) $\beta 1$ -ahel, (D) $\beta 3$ -ahel, (F) $\alpha 5$ -ahel, (G) $\beta 2$ -ahel, (H) $\gamma 1$ -ahel, (I) $\alpha 3$ -ahel. Aktiin: (E), (J).

Saadud tulemuste (Joonis 8) põhjal võib öelda, et laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 3$ -, $\alpha 3$ -, $\gamma 1$ -ahelate dünaamika on endomeetriumi arengutsükli sekretoorse faasi jooksul muutuv, kuid $\alpha 4$ -, $\beta 2$ -ahelate puhul seda väita ei saa.

2.2.6. Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumi epiteelirakkudes menstruaaltsükli erinevatel ajahetkedel

Selleks, et teada saada, kas endomeetriumi koe puhul nähtud muutused laminiini $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -ahelate ekspressiooni dünaamikas endomeetriumi arengutsükli jooksul esinevad ka epiteelirakkudes, kasutasime erinevatel päevadel endomeetriumist eraldatud epiteelirakkude lüsaate. Valkude lahutamiseks kasutasime 4%-10% SDS-poliakrüülamiid gradientgeeli redutseeritud tingimustes. Immuunlaigutus analüüsil kasutatud laminiini $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -ahelate vastased antikehad ja sekundaarsed antikehad on toodud vastavalt Tabelis 1 ja Tabelis 2. Valkude üldhulk geelile kantavates valguproovides on võrdsustatud.



Joonis 9. Endomeetriumi arengutsükli erinevatel päevadel eraldatud epiteelirakkude lüsaatide immuunlaigutus. Laminiini ahelad: (A) $\alpha 1$ -ahel; (B) $\beta 1$ -ahel.

Endomeetriumi arengutsükli erinevatel päevadel eraldatud epiteelirakkude lüsaatide analüüsi tulemustest (Joonis 9) selgus, et nii laminiini $\alpha 1$ - kui $\beta 1$ -ahela ekspressioon on endomeetriumi arengutsükli jooksul muutuv. See on suurim proliferatiivse faasi lõpul ning väheneb peale LH järsku tõusu sekretoorse faasi jooksul (Joonis 1).

2.3. Arutelu

Laminiinide ekspressiooni on varasemalt uuritud endometrioosi puhul (Locci *et al.* 2013), kus näidati $\gamma 2$ -ahela olemasolu endomeetriumi epiteelialustes basaalmembraanides ning võrreldi erinevusi selle ekspressioonis endometrioosi põdevate naiste kudedes. Ahela valik tulenes varasemate uuringute põhjal, kus on näidatud selle ahela osalust vähirakkude invasioonil ja metastaseerumisel ning andmete põhjal, mis näitasid erinevusi $\gamma 1$ -ahelat kodeeriva geeni *LAMC1* geeniekspressioonis endometrioosi korral, seega arvati, et sama võib olla ka $\gamma 2$ -ahela puhul. Oma töös näitasid (Locci *et al.* 2013), et endometrioosi haigetel naistel oli endomeetriumis suurenenud $\gamma 2$ -ahela ekspressioon ning järeldati, et selles tulenevalt võib see mõjutada sellistel emaka limaskesta rakkudel äraspidisel menstruatsioonil kõhukelme pindadele kinnitumist. Oma töös näitame, millised laminiini ahelad ekspresseeruvad normaalses endomeetriumis ning milline on nende dünaamika menstruaaltsükli jooksul. Need kirjeldused annavad vajaliku ülevaate, mida saab kasutada endometrioosi uurimiseks või trofoblastide invasiooniks vajamineva keskkonna kirjeldamiseks.

Inimese endomeetriumi rakuliine RL95-2 ja HEC-1-A on pikalt kasutatud mitmesuguste endomeetriumi seotud probleemide uurimiseks. RL95-2 rakuliin, mida kasutatakse retseptiivse endomeetriumi mudelina, on eraldatud 65 aastase naise ning HEC-1-A, mida kasutatakse mitteretseptiivse endomeetriumi mudelina, 71 aastase naise kasvajasest emakakoest (Way *et al.* 1983; Kuramoto *et al.* 1972). Me uurisime laminiini ahelate ekspressiooni nimetatud rakuliinides, et jälgida võimalikke erinevusi, mis võiksid olla seotud endomeetriumi retseptiivsusega. Lisaks avanes antud töö raames võimalus kasutada viljakas eas naise endomeetriumi eraldatud primaarseid epiteeli- ja stroomarakke ning seega võrrelda laminiini ahelate ekspressiooni kartsinoomi rakuliinides ja primaarsete epiteelirakkude vahel ning kirjeldada laminiini ahelate ekspressiooni stroomarakkudes ning endomeetriumi koes.

Katsete tulemusena selgus, et laminiini ahelate koosseis on RL95-2 ja HEC-1-A rakuliinide lüsaatides küll sama, kuid esineb märgatavaid erinevusi ekspressioonitasemes ning maatriksisse sekreteeritavates ahelates. Nii ahelate $\beta 1$, $\beta 2$ kui ka $\gamma 1$ puhul on RL95-2 rakkude lüsaadis nähtavalt suurem ekspressioon kui HEC-1-A rakkude lüsaadis (Joonis 4), muuhulgas sekreteeritakse maatriksisse neist ühiselt vaid $\beta 2$ -ahel nagu toodud joonistel 4 ja 5. Lisaks sekreteerivad RL95-2 rakud erinevalt HEC-1-A rakkudest maatriksisse ka $\gamma 1$ -ahelat (Joonis

5D). Nimetatud erinevus γ 1-ahela sekretsioonis võib olla üks faktoritest, mille tõttu HEC-1-A rakkudel esineb vähenenud retseptiivsus. Põhjuseks, miks γ 1-ahel on siiski HEC-1-A lüsaadis tuvastatav, võib olla laminiini sekretsiooni eripära, mis seisneb selles, et β - ja γ -ahelate sekretsiooni limiteerib α -ahela süntees (Yurchenco *et al.* 1997). Vaadates kartsinoomi rakkude lüsaatide immuunlaigutuse tulemusi (Joonis 4) on näha, et tuvastavate α -ahelate ekspressioon on madalam kui β - ja γ -ahelate puhul, seega võivad nad α -ahela puudumise tõttu raku tsütoplasmasse koguneda, mida on varemgi näidatud (Yurchenco *et al.* 1997). Kuigi see võiks seletada erinevust rakulüsaatides, on ka maatriksis α -ahelatel ekspressioon madalam (Joonis 5). Rakuvälise maatriksi puhul on ka võimalus, et laminiini ahelad alluvad tugevale proteolüüsile maatriksi metalloproteinaaside poolt, mistõttu on keerulisem ahelaid tuvastada. On näidatud, et maatriksi metalloproteinaas-1, mida ekspresseerivad ka endomeetriumi epiteelirakud (Mizumoto *et al.* 2002), lõikab laminiini α 5-ahela mitmeks fragmendiks suurustega 45 kDa, 310 kDa, 190 kDa, ja 160 kDa (Bair *et al.* 2005). Kartsinoomi rakkude lüsaatides (Joonis 4) sarnase ekspressiooniga α 3- ja β 3-ahelatest sekreteeritakse maatriksisse vaid β 3-ahelaid (Joonis 5C), millel esineb maatriksis madalama molekulmassiga proteolüüsitud ahel, kuid lüsaadis ka täispikk ahel. See viitab β 3-ahela proteolüütilisele töötlusele juba enne maatriksisse sekreteerimist. Lisaks sekreteerivad RL95-2 rakud oma rakuvälisesse maatriksisse rohkem laminiini β 3-ahelaid, kui HEC-1-A rakud. Laminiini α 2-ahelal (Joonis 4A), mida samuti maatriksisse ei sekreteerita, esineb suurem ekspressioon hoopis HEC-1-A rakkudes. Huvitaval kombel sekreteerivad ainult RL95-2 rakud maatriksisse α 5-ahelat (Joonis 5A), mille ekspressiooni ei tuvastatud kummagi rakuliini lüsaatides, aga oli tuvastatav võrdluseks esitatud epiteelirakkude lüsaadis. See on seletatav asjaoluga, et enne maatriksi valkude immuunlaigutust kontsentreerisime maatriksi valkude segu märkimisväärselt, mis tõenäoliselt tõstis laminiini α 5-ahela hulga tuvastamise piirist kõrgemale. Lahuse valgusisalduse juures, kus RL95-2 rakkude lüsaadis ja endomeetriumi epiteelirakkude lüsaadis on laminiini β 1- ja γ 1-ahela ekspressioon võrreldav (Joonis 4), on HEC-1-A rakkude lüsaadi puhul see tunduvalt madalam ja seda ka β 2-ahela puhul. See viitab teatavale sarnasusele RL95-2 rakkude ja normaalse endomeetriumi epiteelirakkude vahel ning võimalikule tähtsusele kartsinoomi HEC-1-A rakkude vähenenud retseptiivsuses. Sama võib näidata ka eelnevalt välja toodud erinevus HEC-1-A ja RL95-2 rakkude poolt sekreteeritud laminiini ahelates, kus HEC-1-A rakud ei sekreteerinud maatriksisse γ 1-ahelat (Joonis 5D).

Laminiini α 2-ahela olemasolu tuvastasime ainult kartsinoomirakkude lüsaadis (Joonis 4A), kuid Church ja kaasautorid (1997) näitasid, et see laminiini ahel paikneb epiteelirakkude

basaalmembraanis. Üks võimalik seletus sellele võib tuleneda meie tehtud katsest, kus võrdlesime epiteelirakkudes ekspresseeruvaid laminiini ahelaid endomeetriumi arengutsükli erinevatel päevadel (Joonis 9). Katse tulemustest on näha, et nii laminiini $\alpha 1$ - kui $\beta 1$ -ahela ekspressioon on endomeetriumi arengutsükli jooksul muutuv. Kusjuures suurenedes proliferatiivses faasis ning vähenedes peale LH järsku tõusu sekretoorse faasis. Sellest saab järeldada, et sarnane ahela vähenemine võib esineda ka laminiini $\alpha 2$ -ahela puhul, mis seletaks, miks meie oma katses selle ekspressiooni primaarsete epiteelirakkude puhul ei tuvastanud. See seletab ka Curch'i ja kaasautorite (1997) kirjeldatud laminiini $\alpha 2$ -ahela ekspressiooni, sest nemad uurisid esimese trimestri detsiiduati. Seega võivad epiteelirakud vähendada teatud laminiini ahelate tootmist endomeetriumi retseptiivse faasi jooksul, mis aitaks kaasa trofoblastide sissetungile läbi epiteelirakkude aluse basaalmembraani.

Meie poolt teostatud immuunlaigutuse analüüsil tuvastatud laminiini ahelate esinemine epiteeli- ja stroomarakkudes ning stroomarakkude poolt moodustatud matriksis kattub suurel määral detsiidua koelõikudest leitud laminiini ahelatega (Church *et al.* 1997). Mõlemal juhul ekspresseeruvad stroomarakkudes laminiini $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\gamma 1$ -ahelad ning epiteelirakkudes $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\gamma 1$ -ahelad. Nendele leidudele lisaks leidsime stroomarakkudest $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\beta 3$ -ahelad ning epiteelirakkudest $\alpha 3$ -, $\beta 3$ -ahelad. Kindlasti tuleb silmas pidada, et käesolevas töös kasutati primaarseid, koest eraldatud strooma- ning epiteelirakke, kuid Church ja kaasautorid (1997) uurisid esimese trimestri detsiiduati. Meie kasutatud primaarsed stroomarakud on eraldatud 8 päeva pärast luteiniseeriva hormooni sekretsiooni maksimumi, kui rakud alustavad juba detsidualiseerumist, kuid detsidualiseerumine on protsess, mis progresseerub kuni implantatsiooni ning raseduse saavutamiseni. See tähendab, et praeguses töös saame võrrelda laminiinide ekspressiooni detsidualiseeruvast koes ja juba detsidualiseerunud koes, kuigi need on funktsioonilt siiski mõnevõrra erinevad. Esimene kude on retseptiivne ja valmistub blastotsüsti implanteerumiseks, teine pole enam retseptiivne, vaid vastutab mõõduka vastupanu eest trofoblastide invasioonil tagades seejuures ka keskkonna platsenta moodustamiseks ja embrüo arenguks.

Nagu öeldud, laminiini $\alpha 2$ -ahela olemasolu tuvastasime ainult kartsinoomirakkude lüsaadis (Joonis 4A), kuid (Church *et al.* 1997) näitasid, et see laminiini ahel paikneb lisaks epiteeli basaalmembraanile ka rakkude vahel. Laminiini $\alpha 2$ -ahela esinemist endomeetriumis seostatakse detsidualiseerunud koe olemasoluga, sest enne detsidualiseerumist seda

stroomarakkudes leitud ei ole (Aplin *et al.* 1995), mis selgitab ka nähtud erinevust strooma puhul.

Samuti erinevad meie tulemused laminiini $\alpha 3$ - ja $\beta 3$ -ahelate ekspressioonis, sest erinevalt meist (Church *et al.* 1997) neid ahelaid oma katsetes ei tuvastanud. See tähendab, et laminiini $\alpha 3$ - ja $\beta 3$ -valguaahelate ekspressiooni detsiiduas ei ole täheldatud, küll aga tuvastasime selle ekspressiooni detsidualiseeruvates stroomarakkudes. Muuseas on nende ekspressiooni endomeetriumis järeldatud koos esineva $\gamma 2$ -ahela sünteesi tõttu (Locci *et al.* 2013). Tuleb märkida, et käesolevas me leidsime nii epiteelist, stroomarakkudest ja selle eritatud maatriksist kahe erineva molekulmassiga laminiini $\alpha 3$ -ahelaid (Joonised 4B, 6B, 7D) ning koos ainult ühe molekulmassiga (Joonis 8I.), mis tõenäoliselt tähendab, et nendel on hinge piirkonnast ära lõigatud LG4-5 domeenid (Joonis 2). Sellist $\alpha 3$ -ahelate modifitseerimist on näidatud laminiin-332 puhul, kus sellega kaasnes suurenenud afiinsus $\alpha 3\beta 1$ integriini suhtes, mis võib mõjutada rakkude kinnitumist ning migreerumist (Künneken *et al.* 2004; Giannelli *et al.* 2007). Normaalses koos *in vivo* pole äralõigatud LG4-5 domeene leitud, seega tõenäoliselt on nende lagundamine vajalik koe normaalsete funktsioonide tagamiseks (Künneken *et al.* 2004). Lisaks on näidatud, et nende domeenide säilimine koos on vajalik soomusrakulise kartsinoomi (SCC) kartsinogeneesiks ning LG4-5 domeenide vastaste antikehade kasutamine takistas SCC arengut (Tran *et al.* 2008).

Stroomarakkude maatriksis ja epiteelirakkudes tuvastasime lisaks $\alpha 3$ -ahelale ka $\beta 3$ -ahela olemasolu, seega võime väita, et üheks endomeetriumi koos esinevaks trimeeriks on laminiin-332 (Joonis 2). Olgugi, et siin töös $\gamma 2$ -ahela tuvastamine ei õnnestunud, on endomeetriumis RT-PCR abil näidatud konstitutiivset *LAMC2* mRNA ekspressiooni (Locci *et al.* 2013). Seejuures on immunohistokeemiliselt näidatud $\gamma 2$ -ahelate paiknemist luminaalsete ja näärmeliste epiteelirakkude basaalmembraanis, kuid mitte stroomas (Giannelli *et al.* 2007; Locci *et al.* 2013), mis erineb meie poolt leitud $\beta 3$ -ahela ekspressioonist stroomarakkude lüsaadis ja maatriksis (Joonis 6G). Senini teadaolevalt esineb laminiini $\beta 3$ -ahel ainult laminiin-332 trimeeris, seega $\beta 3$ -ahela tuvastamine eeldab ka $\gamma 2$ -ahela olemasolu. Siiski on avaldatud üks töö laminiin-333 kohta roti testise koos (Yan ja Cheng 2006). Kuna laminiini $\alpha 3$ - ja $\beta 3$ -ahelaid ehk tõenäoliselt laminiini-332 esimese trimestri detsidualiseerunud stroomarakkudes leitud ei ole (Aplin *et al.* 1995; Church *et al.* 1997), siis võib oletada, et see laminiini isovorm kaob endomeetriumist mõni aeg peale blastotsüsti implantatsiooni. Laminiini-332 olemasolu detsidualiseeruvates rakkudes toetab ka endomeetriumi sekretoorset faasi võrdlev

immuunlaigutuse analüüs, kus me näitasime $\alpha 3$ -ahela ekspressiooni (Joonis 8I) LH+8 proovides, kuid mitte LH+2 proovides. Lisaks sellele on märgatavalt tõusnud $\beta 3$ -ahela ekspressiooni tase (Joonis 8D). Tõenäoliselt viitab see jällegi sellele, et detsidualiseerumise käigus ekspresseerub endomeetriumis laminiin-332 ning $\alpha 3$ - ja $\beta 3$ -ahelate puudumine detsiidas (Aplin *et al.* 1995; Church *et al.* 1997) viitab nende kadumisele raseduse käigus. RT-PCR tulemused on näidatud, et laminiin $\beta 3$ -ahelat kodeeriva geeni *LAMB3* ekspressioon suureneb LH+7 ehk retseptiivse faasi puhul (Haouzi *et al.* 2009; Zhao *et al.* 2010), kuid samas on näidatud ka, et vastavalt $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -ahelaid kodeerivate geenide *LAMA1* ja *LAMA3* ekspressioon väheneb (Zhao *et al.* 2010). Olgugi et läbiviidud immuunlaigutus epiteelirakkude lüsaatides endomeetriumi arengutsükli jooksul (Joonis 9) näitas, et retseptiivsuse saavutamisel väheneb $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -ahelate ekspressioon, siis endomeetriumi koeproovide võrdleva analüüsi (Joonis 8) tulemused erinesid sellest. Muidugi tuleb arvestada, et kude on heterogeenne rakkude kogum. Samast analüüsist selgus veel, et laminiini $\alpha 5$ - ja $\beta 1$ -ahelate dünaamika on tsükli jooksul muutuv, suurenedes LH+8 puhul (Joonised 8F ja 8C). Detsidualiseerumise protsessi käigus on märgata 95 kDa suuruse $\beta 1$ -ahela fragmendi teket (Joonis 8C), mis võib viidata lisaks ahela sünteesi suurenemisele ka selle suurenenud proteolüüsile. Laminiini $\beta 1$ -ahela vastase antikehaga teostatud immunosadestamine näitas, et lisaks laminiin-332 trimeerile ekspresseerivad stroomarakud ka laminiine-111, -411, -311, -511 (Joonis 7). Ilmselt materjali vähesuse tõttu ei õnnestunud meil laminiine immuunsadestada stroomarakkude poolt toodetud maatriksist.

KOKKUVÕTE

Senini on inimese endomeetriumis ekspresseeruvate laminiinide kõige põhjalikum analüüs näidanud laminiini alaühikute $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$ esinemist esimese trimestri detsiiduas. Laminiinide olemasolu ja nende ekspressiooni dünaamika uurimisel on üldiselt kasutatud polükloonaalseid antikehi, kuid mitte spetsiifiliste alaühikute vastaseid antikehi. Küll aga on endomeetriumis näidatud endometrioosi uuringutega $\gamma 2$ -ahela ekspressiooni. Sellest lähtuvalt huvitas meid, millised laminiini ahelad ja eriti trimeersed molekulid sisalduvad inimese endomeetriumi stroomas ja epiteelirakkudes ning nende poolt sekreteeritud rakuvälises maatriksis. Eriti huvitas meid laminiinide ekspressioon endomeetriumi rakuvälises maatriks, kuivõrd senini oli seal näidatud ainult üksikute laminiini ahelate olemasolu ja seda just hiire, mitte inimese endomeetriumis. Peale selle tahtsime välja selgitada kas laminiini üksikute ahelate või tervete isovormide ekspressioonis toimub mingeid muutusi endomeetriumi detsidualiseerumise protsessi käigus.

Töös võrreldi laminiini ahelate ekspressiooni kartsinoomi rakuliinide RL95-2 ja HEC-1-A ning retseptiivse faasi endomeetriumi epiteelirakkude vahel. Leidsime, et endomeetriumi retseptiivse faasi epiteeli basaalmembraani koostises on laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$, $\gamma 1$ -ahelad ning tõenäoliselt $\gamma 2$ -ahelad ja laminiin-332 trimeer. Kusjuures $\beta 1$ -, $\beta 2$ -ahelate madalam ekspressioon, $\alpha 2$ -ahela ekspressioon ja $\alpha 5$ - ning $\gamma 1$ -ahelate puudumine maatriksist HEC-1-A rakkudel võivad olla ühed põhjused, miks neil rakkudel esineb mitteretseptiivne fenotüüp. See tähendab, et muutunud laminiinide koostis endomeetriumis võib olla potentsiaalne sihtmärk viljatuse uuringus, diagnostikas ja ravis.

Uuriti ka laminiini ahelaid ning isovorme retseptiivse faasi endomeetriumi stroomarakkudes, kus selgus, et stroomarakud sekreteerivad laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 3$ -, $\alpha 4$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelaid, millest tulenevalt võib eeldada $\gamma 2$ -ahela ning laminiini-332 trimeeri olemasolu. Lisaks immuunsadestati laminiini $\beta 1$ -ahela vastaste antikehadega stroomarakkude lüsaadist laminiini-111, -411, -311, -511 isovormid.

Sekretoorse faasi erinevatel ajahetkedel eemaldatud koeproovide lüsaatides uurisime laminiini ahelate dünaamikat, kus leidsime, et retseptiivses faasis tõuseb endomeetriumis laminiini $\alpha 1$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 1$ -, $\beta 2$ -, $\beta 3$ - ja $\gamma 1$ -ahelate ekspressioon, epiteelirakkudes vähenevad vastavalt $\alpha 1$ - ja $\beta 1$ -ahelad. Seega vastutavad suurenenud ekspressiooni eest teised endomeetriumi rakud, tõenäoliselt detsidualiseeruvad stroomarakud või koeprooviga kaasa tulnud endoteelirakud. On alust arvata, et epiteelirakud vähendavad mõndade laminiinide ekspressiooni implanteeruva

blastotsüsti tarbeks. Kuna laminiinide ekspressioon on tsükli jooksul muutuv, siis viitab see nende hormonaalsele regulatsioonile. Uurides, kuidas muutub laminiinide koostis vastusena tsüklit ja rasedust kontrollivatele hormoonidele, võib leida, millistel laminiinidel on määrav roll raseduse edukaks toimumiseks.

Locci ja kaasautorite (2013) poolt läbiviidud uuringus näidati, et laminiini-332 koosseisus oleva $\gamma 2$ -ahela suurenenud ekspressioon endometrioosi põdevatel inimestel võib olla põhjuseks äraspidisel menstruatsioonil irduvate rakkude kinnitumisel kõhukelme pindadele. Meie tulemused kinnitasid laminiini-332 ekspressiooni endomeetriumis. Asjaolu, et me tuvastasime endomeetriumis uusi laminiini ahelaid ja isovorme võimaldab täpsemalt uurida laminiinide rolli endometrioosi väljakujunemises.

Expression of laminin chains in the human endometrium

Helen Kiik

SUMMARY

Every month the lining of the uterus, which is called the endometrium, undergoes changes necessary for blastocyst implantation. The trophoblast cells of the implanting embryo are very invasive. Their objective is to penetrate through the endometrial epithelial basement membrane and the underlying stromal extracellular matrix to reach the mother's blood flow. A successful contact is obligatory for embryo gestation for it serves as the source of nutrition for the developing fetus. The endometrium is not receptive throughout the cycle, but only for a small amount of time termed the window of implantation. Since the endometrium must support the invading trophoblast cells, but also constrict their invasive nature, changes in its extracellular matrix composition occur and stromal cells undergo decidual transformation. Extracellular matrix proteins that regulate the function, proliferation, differentiation of various cells in the body are called laminins. In addition, laminins are also responsible for cell adhesion and migration. During implantation, the composition of laminins must support the penetration of the epithelial basement membrane and guide the invasion process. Any deviation from the precise composition of the extracellular matrix may result in pregnancy failure, preeclampsia and endometriosis. To understand the precise mechanism of implantation and implantation failure as well as endometriosis, one must be aware of the normal distribution of laminins in the endometrium.

The aim of this study was to describe the expression of laminin chains by the human uterine epithelial cell lines RL95-2 and HEC-1-A and compare the results with normal uterine epithelial cells. The cell lines provide a model for a receptive (RL95-2) and nonreceptive (HEC-1-A) endometrium. The next step was to evaluate the expression of laminin chains in stromal cells and describe possible isoforms in the endometrium. Lastly we viewed the dynamics of chains during the secretory phase.

The results of the comparison between cell lines and epithelial cells imply that laminin chains $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ and most likely $\gamma 2$ chain as well as laminin-322 trimer are components of the epithelial basement membrane in the receptive endometrium. The expression of RL95-2 cells was much like the expression in primary epithelial cells, which was to be expected as they

are both epithelial cells with a receptive phenotype. HEC-1-A cells on the other hand showed limited expression of $\beta 1$ -, $\beta 2$ -chains, no expression of $\gamma 1$ chains and an increased expression of $\alpha 1$ chain in its extracellular matrix. This may contribute to the nonreceptive nature of HEC-1-A cells and it shows that there is a difference in laminin chain composition of the receptive and nonreceptive epithelial basement membranes, which may serve as a potential platform for further studies. Receptive phase stromal cells express $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ and $\gamma 1$ chains and expression of $\gamma 2$ chain and laminin-332 are also expected in addition to the immunoprecipitated laminin-111, -411, -311, -511 isoforms. The dynamics of laminin expression showed an upregulation of laminin $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ and $\gamma 1$ chains during the secretory phase endometrium. The decline in $\alpha 1$ -, $\beta 1$ -chains in the epithelial cells demonstrates that other cells of the endometrium are responsible for the seen increase in laminin chain expressions. This correlates well with the decidualizing profile of stromal cells. A previous study (Locci *et al.* 2013) showed a higher expression of laminin $\gamma 2$ chain of laminin-332 in women with endometriosis, with the speculation that it may facilitate the adhesion of endometrial cells to the peritoneum during a retrograde menstruation. Our findings of laminin isoforms provide a deeper understanding of the endometrial extracellular matrix and new targets for endometriosis studies.

TÄNUAVALDUS

Soovin tänada oma juhendajaid, Sulev Ingerpuud ning Artjom Stepanjuki, juhendamise, toe ja abi eest. Viljar Jaksi suunamise ning mitmete laminiini vastasete antikehade kasutamise võimaluse eest. Martin Pooki ja Arina Lavritsit asjakohase nõu ja igakülgse abi eest ning rakubioloogia kollektiivi sooja, abivalmi ja koduse õhkkonna eest. Tänan professor Andres Salumetsa ja Tervisetehnoloogiate AK töötajaid heade nõuannete ning abi eest, endomeetriumi koeproovide saamisel ja primaarsete rakuliinide kasvatamisel.

- Adachi M., Nasu K., Tsuno A., Yuge A., Kawano Y., Narahara H. (2011) Attachment to extracellular matrices is enhanced in human endometriotic stromal cells: A possible mechanism underlying the pathogenesis of endometriosis. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **155**, 85–88.
- Adams S. M., Gayer N., Hosie M. J., Murphy C. R. (2002) Human uterodomes (pinopods) do not display pinocytotic function. *Hum. Reprod.* **17**, 1980–1986.
- Aplin J. D., Charlton A. K., Ayad S. (1988) An immunohistochemical study of human endometrial extracellular matrix during the menstrual cycle and first trimester of pregnancy. *Cell Tissue Res.* **253**, 231–240.
- Aplin J. D., Fazleabas A. T., Glasser S. R., Giudice L. C. (2008) *The Endometrium: Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*.
- Aplin J. D., Mylona P., Kielty C. M., Ball S., Williams J. D. L., Church H. J., Jones C. J. P. (1995) Collagen VI and Laminin as Markers of Differentiation of Endometrial Stroma, in *Mol. Cell. Asp. Periimplantation Process.*, (Dey S. K., toim), lk 331–351. Springer-Verlag, New York.
- Arnold J. T., Kaufman D. G., Seppälä M., Lessey B. a (2001) Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum. Reprod.* **16**, 836–845.
- Aumailley M., Bruckner-Tuderman L., Carter W. G., Deutzmann R., Edgar D., Eklom P., Engel J., et al. (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24**, 326–332.
- Bair E. L., Chen M. L., McDaniel K., Sekiguchi K., Cress A. E., Nagle R. B., Bowden G. T. (2005) Membrane type 1 matrix metalloprotease cleaves laminin-10 and promotes prostate cancer cell migration. *Neoplasia* **7**, 380–9.
- Bentin-Ley U., Sjögren A., Nilsson L., Hamberger L., Larsen J. F., Horn T. (1999) Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation in vitro. *Hum. Reprod.* **14**, 515–520.
- Bergh P. A., Navot D. (1992) The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertil. Steril.* **58**, 537–542.
- Brar A. K., Frank G. R., Kessler C. A., Cedars M. I., Handwerger S. (1997) Progesterone-

- Dependent Decidualization of the Human Endometrium is Mediated by cAMP. *Endocrine* **6**, 301–307.
- Cavazos F., Green J. A., Hall D. G., Lucas F. V. (1967) Ultrastructure of the human endometrial cycle glandular cell during the menstrual. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **99**, 833–854.
- Cheng Y., Champlaud M., Burgeson R. E., Marinkovich M. P., Yurchenco P. D. (1997) Self-assembly of Laminin Isoforms * thought to contribute to basement membrane architecture. *October* **272**, 31525–31532.
- Church H. J., Richards A. J., Aplin J. D. (1997) Laminins in Decidua, Placenta and Choriocarcinoma Cells. *Placenta* **18**, 143–162.
- Classen-Linke I., Kusche M., Knauthe R., Beier H. M. (1997) Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res.* **287**, 171–185.
- Cooper A. R., Kurkinen M., Taylor A., Hogan B. L. M. (1981) Studies on the Biosynthesis of Laminin by Murine Parietal Endoderm Cells. *Eur. J. Biochem.* **119**, 189–197.
- Cornille F. J., Lauweryns J. M., Brosens I. A. (1985) Normal Human Endometrium. *Gynecol. Obs. Invest* **20**, 113–129.
- Cross J. C., Werb Z., Fisher S. J. (1994) Implantation and the Placenta: Key Pieces of the Development Puzzle. *Science (80-.).* **266**, 1508–1518.
- Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. (2012) Functional Diversity of Laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**, 523–553.
- Dunn C. L., Kelly R. W., Critchley H. O. (2003) Decidualization of the human endometrial stromal cell: an enigmatic transformation. *Reprod. Biomed. Online* **7**, 151–161.
- Durbeej M. (2010) Laminins. *Cell Tissue Res.* **339**, 259–268.
- Faber M., Wewer U. M. (1986) Laminin Production by Human endometrial Stromal Cells Relates to the Cyclic and Pathologic State of the Endometrium. **124**, 384–391.
- Ferenczy A., Bergeron C. (1991) Histology of the Human Endometrium: From Birth to Senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **622**, 6–27.
- Ferenczy A., Guralnick M. (1983) Endometrial microstructure: Structure-function relationships throughout the menstrual cycle. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **1**, 205–219.

- Foidart J. M., Hunt J., Lapiere C. M., Nusgens B., Rycker C. De, Bruwier M., Lambotte R., Bernard A., Mahieu P. (1986) Antibodies to laminin in preeclampsia. *Kidney Int.* **29**, 1050–1057.
- Gellersen B., Brosens I. A., Brosens J. J. (2007) Decidualisation of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin. Reprod. Med.* **25**, 445–453.
- Gellersen B., Brosens J. J. (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium : a decidualizing affair. *J. Endocrinol.* **178**, 357–372.
- Giannelli G., Sgarra C., Naro E. Di, Lavopa C., Angelotti U., Tartagni M., Simone O., Trerotoli P., Antonaci S., Loverro G. (2007) Endometriosis is characterized by an impaired localization of laminin-5 and $\alpha 3 \beta 1$ integrin receptor. *Int. J. Gynecol. Cancer* **17**, 242–247.
- Halasz M., Szekeres-Bartho J. (2013) The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *J. Reprod. Immunol.* **97**, 43–50.
- Haouzi D., Mahmoud K., Fourar M., Bendhaou K., Dechaud H., Vos J. De, Rème T., Dewailly D., Hamamah S. (2009) Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum. Reprod.* **24**, 198–205.
- Harduf H., Goldman S., Shalev E. (2007) Human uterine epithelial RL95-2 and HEC-1A cell-line adhesiveness: the role of plexin B1. *Fertil. Steril.* **87**, 1419–1427.
- Iwahashi M., Muragaki Y., Ooshima A., Yamoto M., Nakano R. (1996) Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J. Reprod. Fertil.* **108**, 147–155.
- John N. J., Linke M., Denker H.-W. (1993) Retinoic acid decreases attachment of JAR choriocarcinoma spheroids to a human endometrial cell monolayer in vitro. *Placenta* **14**, 13–24.
- Kitawaki J., Kado N., Ishihara H., Koshiba H., Kitaoka Y., Honjo H. (2003) Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**, 149–155.
- Klemmt P. A. B., Carver J. G., Koninckx P., McVeigh E. J., Mardon H. J. (2007) Endometrial cells from women with endometriosis have increased adhesion and proliferative capacity in response to extracellular matrix components: Towards a mechanistic model for endometriosis progression. *Hum. Reprod.* **22**, 3139–3147.

- Koch M., Olson P. F., Albus A., Jin W., Hunter D. D., Brunken W. J., Burgeson R. E., Champlaud M. F. (1999) Characterization and expression of the laminin $\gamma 3$ chain: A novel, non- basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell Biol.* **145**, 605–617.
- Künneken K., Pohlentz G., Schmidt-Hederich A., Odenthal U., Smyth N., Peter-Katalinic J., Bruckner P., Eble J. A. (2004) Recombinant human laminin-5 domains: Effects of heterotrimerization, proteolytic processing, and N-glycosylation on $\alpha 1 \beta 1 \gamma 3$ integrin binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 5184–5193.
- Kuramoto H., Tamura S., Notake Y. (1972) Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **114**, 1012–1019.
- Locci R., Nisolle M., Angioni S., Foidart J.-M., Munaut C. (2013) Expression of the gamma 2 chain of laminin-332 in eutopic and ectopic endometrium of patients with endometriosis. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **11**, 94.
- Ludwig H., Metzger H. (1976) The re-epithelization of endometrium after menstrual desquamation. *Arch. Gynakol.* **221**, 51–60.
- Männik P. (2010) *Endomeetriumi epiteelirakkude muutused viljatutel patsientidel korduvate ebaõnnestunud IVF protseduuride korral*. Tartu Ülikool.
- Miner J. H., Yurchenco P. D. (2004) Laminin Functions in Tissue Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 255–284.
- Mizumoto H., Saito T., Ashihara K., Nishimura M., Takehara M., Tanaka R., Ito E., Kudo R. (2002) Expression of matrix metalloproteinases in ovarian endometriomas: Immunohistochemical study and enzyme immunoassay. *Life Sci.* **71**, 259–273.
- More I. A. R., Armstrong E. M., Carty M., McSeveny D. (1974) Cyclical Changes in The Ultrastructure of The Normal Human Endometrial Stromal Cell. *J. Obstet. Gynaecology Br. Commonw.* **81**, 337–347.
- Mulholland J., Aplin J. D., Ayad S., Hong L., Glasser S. R. (1992) Loss of Collagen Type VI from Rat Endometrial Stroma during Decidualization. *Biol. Reprod.* **46**, 1136–1143.
- Murphy C. R. (2000) Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods- or uterodomes? *Hum Reprod* **15**, 2451–2454.
- Nikas G., Develioglu O. H., Toner J. P., Jones, Jr H. W. (1999) Endometrial pinopodes indicate a shift in the window of receptivity in IVF cycles. *Hum. Reprod.* **14**, 787–792.

- Rohde L. H., Carson D. D. (1993) Heparin-like glycosaminoglycans participate in binding of a human trophoblastic cell line (JAR) to a human uterine epithelial cell line (RL95). *J. Cell. Physiol.* **155**, 185–196.
- Sampson J. A. (1927) Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation. *Am. J. Pathol.* **14**, 422–469.
- Sarani S. A., Ghaffari-Novin M., Warren M. A., Dockery P., Cooke I. D. (1999) Morphological evidence for the „implantation window“ in human luminal endometrium. *Hum. Reprod.* **14**, 3101–3106.
- Schenk S., Hintermann E., Bilban M., Koshikawa N., Hojilla C., Khokha R., Quaranta V. (2003) Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J. Cell Biol.* **161**, 197–209.
- Schlafke S., Enders A. C. (1975) Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol. Reprod.* **12**, 41–65.
- Schultz J. F., Armant D. R. (1995) Beta 1- and beta 3-class integrins mediate fibronectin binding activity at the surface of developing mouse peri-implantation blastocysts. Regulation by ligand-induced mobilization of stored receptor. *J. Biol. Chem.* **270**, 11522–11531.
- Sharpe-Timms K. L. (2001) Endometrial anomalies in women with endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **943**, 131–147.
- Smyth N., Vatansever H. S., Murray P., Meyer M., Frie C., Paulsson M., Edgar D. (1999) Absence of Basement Membranes after Targeting the. *J cell biol* **144**, 151–160.
- Streuli C. (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 634–640.
- Sutherland A. E., Calarco P. G., Damsky C. H. (1993) Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* **119**, 1175–86.
- Timpl R., Rohde H., Robey P. G., Rennard S. I., Foidart J. M., Martin G. R. (1979) Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254**, 9933–9937.
- Tran M., Rousselle P., Nokelainen P., Tallapragada S., Nguyen N. T., Fincher E. F., Marinkovich M. P. (2008) Targeting a tumor-specific laminin domain critical for human carcinogenesis. *Cancer Res.* **68**, 2885–2894.
- Turpeenniemi-Hujanen T., Rönberg L., Kauppila A., Puistola U. (1992) Laminin in the human

- embryo implantation: analogy to the invasion by malignant cells. *Fertil. Steril.* **58**, 105–13.
- Way D., Grosso D., Davis J., Surwit E. (1983) Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *Vitr. Cell. &* **19**.
- Wienke E. C., Cavazos F., Hall D. G., Lucas F. V. (1968) Ultrastructure of the human endometrial stroma cell during the menstrual cycle. *Am. J. Obs. Gynec.* **102**, 65–77.
- Wira C. R., Rodriguez-Garcia M., Patel M. V. (2015) The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 217–230.
- Witz C. A., Montoya-Rodriguez I. A., Cho S., Centonze V. E., Bonewald L. F. (2001) Composition of the extracellular matrix of the peritoneum. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **8**, 299–304.
- Yan H. H. N., Cheng C. Y. (2006) Laminin $\alpha 3$ forms a complex with $\beta 3$ and $\gamma 3$ chains that serves as the ligand for $\alpha 6\beta 1$ -integrin at the apical ectoplasmic specialization in adult rat testes. *J. Biol. Chem.* **281**, 17286–17303.
- Yurchenco P. D., Lu P., Takai K., Weaver V. M., Hynes R. O., Naba A., Huttenlocher A., et al. (2012) Basement Membranes : Cell Scaffoldings and Signaling Platforms. 1–28.
- Yurchenco P. D., Quan Y., Colognato H., Mathus T., Harrison D., Yamada Y., O’Rear J. J. (1997) The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10189–10194.
- Zhao Y., Garcia J., Kolp L., Cheadle C., Rodriguez A., Vlahos N. F. (2010) The impact of luteal phase support on gene expression of extracellular matrix protein and adhesion molecules in the human endometrium during the window of implantation following controlled ovarian stimulation with a GnRH antagonist protocol. *Fertil. Steril.* **94**, 2264–2271.
- Zhou Y., Damsky C. H., Chiu K., Roberts J. M., Fisher S. J. (1993) Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J. Clin. Invest.* **91**, 950–60.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Helen Kiik

Sünnikuupäev: 11.03.1995

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

“Laminiini ahelate ekspressioon inimese endomeetriumis”,

mille juhendajad on Sulev Ingerpuu ja Artjom Stepanjuk,

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **01.01.2020** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 29.05.17